Genkartierung und Klonierung von ribosomaler DNS höherer Pflanzen, Bindungsstudien mit RNS-Polymerase I und Ansätze zur Strukturgenisolierung aus Sojabohnenzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von
Harald Friedrich
aus
Treysa
1980

80 480

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0027

GENKARTIERUNG UND KLONIERUNG VON RIBOSOMALER DNS HÖHERER PFLANZEN, BINDUNGSSTUDIEN MIT RNS-POLYMERASE I UND ANSÄTZE ZUR STRUKTURGENISOLIERUNG AUS SOJABOHNENZELLEN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt
von

H a r a l d F r i e d r i c h

aus
Treysa

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	12. Juni 1980
Dekan (am Tag der mündlichen Prüfung)	Prof. Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter	Prof. Dr. V. Hemleben
2. Berichterstatter	Prof. Dr. W. Seyffert

Mein Dank gilt besonders Frau Prof. Dr. V. Hemleben, die mir die Durchführung dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht und hilfreich zur Seite gestanden hat. Für ihren Einsatz bei der Initiierung der wissenschaftlichen Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Dr. J. L. Key, Athens, U.S.A. , möchte ich mich nachdrücklich bedanken. Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. J. L. Key für die hilfreiche Unterstützung während meines Aufenthaltes in seinem Labor. Herrn K. Großmann (Institut für Biologie I) danke ich herzlich für die kollegiale Zusammenarbeit. Für wissenschaftlich anregende Gespräche danke ich Prof. Dr. W. Seyffert.

Für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten bedanke ich mich bei Frau A. Roth und den Herren Mayer und Schmidt von der Werkstatt des Instituts für Biologie II.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 5

2.1. Isolierung und Anreicherung von pflanzlicher rDNS 5

2.1.1. Puffer und Lösungen 5
2.1.2. Anzucht des pflanzlichen Materials 7
2.1.3. DNS-Isolierung und CsCl-Actinomycin D-Gradienten 7
2.1.4. Restriktionsenzymabbau 7
2.1.5. Agarosegelelektrophorese der abgebauten rDNS 8
2.1.6. Eluierung der DNS aus Agarosegelen 9
2.1.7. Isolierung und Jodierung von ribosomaler RNS aus Sojabohnen 9
2.1.8. Hybridisierung der Southern-Blots 11

2.2. Klonierung von angereicherter rDNS 12

2.2.1. Puffer und Lösungen 12
2.2.2. Herstellung einer großen Menge unvollständig abgebauter DNS 16
2.2.3. Präparative Agarosegelelektrophorese 16
2.2.4. Hybridisierung der Fraktionen aus der präparativen Elektrophorese mit ^{125}Jod-rRNS 17
2.2.5. Ligation der rRNS-Fraktion mit dem Resistenzplasmid pBR 322 17
2.2.6. Transformation 18
2.2.7. Screening der Transformanten 19
2.2.8. Koloniehybridisierung 20
2.2.9. Cycloserin-Anreicherungsmethode 21

2.2.10. Schnellnachweis und Charakterisierung der Plasmid-DNS 21
2.2.11. Anzucht und Isolierung von Plasmid-DNS im Litermaßstab 22
2.2.12. Propidiumjodid-CsCl-Gradienten 23
2.2.13. Charakterisierung der klonierten DNS 24

2.3. "Tailing" von angereicherter rDNS und pBR 322-DNS und anschließende Klonierung 25

2.3.1. Puffer und Lösungen 25
2.3.2. Anreicherung der rDNS 26
2.3.3. "Tailing" der angereicherten Soja-rDNS 26
2.3.4. Pst I-Abbau des Resistenzplasmids pBR 322 27
2.3.5. "Tailing der abgebauten pBR 322-DNS 27
2.3.6. "Annealing"-Reaktion (=Verknüpfung) 28
2.3.7. Überprüfung der"Annealing"-Reaktion 28
2.3.8. Transformation 29
2.3.9. Weiterverarbeitung der Transformanten 30

2.4. Klonierung von nicht- angereicherter rDNS 31

2.4.1. Puffer und Lösungen 31
2.4.2. Hind III-Abbau von pBR 322 32
2.4.3. Alkalische Phosphatase-Behandlung des abgebauten Plasmids 32
2.4.4. Hind III-Abbau der Sojabohnen-Gesamt-DNS 32
2.4.5. Ligation der beiden DNS-Spezies mit T_4-Ligase 33
2.4.6. Transformation, Screening und Koloniehybridisierung 33
2.4.7. Anzucht der einzelnen rDNS-Klone 33
2.4.8. Charakterisierung der rekombinanten DNS 34

2.5. Bindung von Sojabohnen-RNS-Polymerase I an geklonte Soja-rDNS 35

2.5.1. Puffer, Lösungen und Säulenmaterial 35
2.5.2. Isolierung der Sojabohnen-RNS-Polymerase I 39
2.5.3. Salz- und Ionenabhängigkeit der RNS-Polymerase I 40
2.5.4. Isolierung der Insert-DNS aus dem rDNS-Plasmid pFKM 206 40
2.5.5. Bindungsstudien mit RNS-Polymerase I an rDNS 41
2.5.6. Affinitätschromatographie von RNS-Polymerase I an rDNS-Plasmide 43
2.5.6.1. Herstellung der Sepharose 4B-rDNS-Säule 43
2.5.6.2. Affinitätschromatographie 43

2.6. Präparative Auftrennung von Sojabohnen-poly A^+- und poly A^--RNS 45

2.6.1. Puffer und Lösungen 45
2.6.2. Anzucht der Soja-Suspensionskultur 48
2.6.3. Isolierung von poly A^+-RNS aus den Sojazellen 48
2.6.3.1. Vorbereitung der Lösungen und Materialien 48
2.6.3.2. Extraktion der Nukleinsäuren 49
2.6.3.3. CsCl-Gradienten 50
2.6.3.4. Oligo dT-Affinitätschromatographie 50
2.6.4. Markierung von poly A^+-RNS In-vitro mit ^{125}Jod 51
2.6.5. Charakterisierung der Komplexität von poly A^+- und poly A^--RNS 52
2.6.5.1. Präparative Auftrennung von poly A^+-und poly A^--RNS 52
2.6.5.2. Hybridisierung der einzelnen poly A^+- und poly A^--RNS-Fraktionen 52

3. Ergebnisse 54

3.1. Restriktionskartierung der ribosomalen Gene 54

3.1.1. Isolierung und Jodierung von ribosomaler rRNS 54
3.1.2. Restriktionsfragmentierung der Brassica pekinensis 18 S und 25 S rRNS-Gene 58
3.1.3. Restriktionsfragment-Kartierung der Matthiola incana-rDNS 71
3.1.4. Restriktionsfragmentkartierung der Cucumis melo r DNS 76
3.1.5. Restriktionsfragmentkartierung der Phaseolus aureus-rDNS 86
3.1.6. Nachweis von 5 S rRNS-Coding-Regionen 94

3.2. Klonierung von angereicherter Sojabohnen rDNS 96

3.2.1. Klonierung des 3,8 x 10^6 Dalton Bst I Fragments 96
3.2.2. Klonierung angereicherter rDNS mit der Methode des "Tailing" 101
3.2.3. Klonierung von Hind III geschnittener Gesamt-Soja-DNS 103
3.2.3.1. Charakterisierung der Klone pFKM 97 und pFKM 206 105
3.2.3.2. Charakterisierung der Klone pFKM 481-960 110
3.2.3.3. Charakterisierung der Klone mit Histongen-cDNS 118

3.3. Interaktion zwischen RNS-Polymerase I und klonierter rDNS 120

3.3.1. Bestimmung der optimalen Bindungsbedingungen der RNS-Polymerase I 120
3.3.2. Bindungsexperimente von Soja-RNS- Polymerase I an die rDNS-Insertion von pFKM 206 126
3.3.3. Affinitätschromatographie mit dem Plasmid pFKM 206 137

3.4. Komplexität der poly A^+-und poly A^--RNS aus der Sojabohne 139

4. Diskussion 145

4.1. Kartierung von ribosomalen RNS-Genen 145

4.2. Klonierung von ribosomalen RNS-Genen 157

4.3. Komplexität der Soja mRNS 164

5. Zusammenfassung 167

6. Literatur 169

7. Anhang 178

7.1. Kinetik der DNS-RNS-Polymerase I-Bindung 178

7.2. Berechnung des erreichbaren r_0t-Wertes bei Hybridisierung der vorfraktionierten RNS mit Gesamt-Soja-DNS 181

1. Einleitung

In eukaryontischen Genomen stellen die repetitiven Gene einen großen Anteil am Gesamtgenom dar (Lewin, 1974; Tartof, 1975). Untersuchungen über diese Genfamilien wurden unter der Fragestellung der biologischen Funktion und Organisation unternommen. Um allgemeingültige Aussagen über die repetitiven Gene zu machen, müssen diese bei verschiedenen Organismen untersucht werden. Eine Klasse der repetitiven Gene, die sich hierfür anbietet, sind die ribosomale RNS-Gene, d.h. die DNS-Sequenzen, die für die 18 S und 28 S rRNS codierten. Diese rDNS wurde von Birnstiel (1966) für Xenopus laevis (Frosch) beschrieben und von weiteren Arbeitsgruppen charakterisiert und analysiert (Wellauer et al. 1976 a, b). Bei Drosophila melanogaster fanden eingehende Untersuchungen zur Genstruktur der rDNS statt (Wellauer and David, 1977; Glover and Hogness, 1977). Untersuchungen bei Säugern, z.B. der Maus liegen ebenfalls vor (Cory and Adams, 1977; Grummt et al., 1979).

Die rDNS von Xenopus laevis besteht aus vielen gleichartigen Geneinheiten ("Repeating-Units"), die tandemartig linear hintereinander gereiht sind (Wellauer et al., 1976a). Die Repeating-Unit wird in einen rRNS-Precursor von 40 S transkribiert, der die transkribierte 18 S und 28 S rRNS-Genregion und zusätzlich eine Spacer-Region enthält. Die rDNS-Repeating-Unit ist aber länger als der komplementäre 40 S rRNS-Precursor. Dieser zusätzliche Sequenzanteil ist der nichttranskribierte Spacer. Er dient der physikalischen Abstandshaltung zwischen zwei Repeating-Units. Die transkribierten Spacer werden im Verlauf des "Processings" aus dem Pre-

cursormolekül herausgeschnitten.

Bei niederen Eukaryonten wurden rDNS-Studien vor allem bei Tetrahymena (Karrer and Gall, 1976; Engberg et al., 1976), Physarum (Vogt and Braun, 1976; Molgaard et al., 1976; Campbell et al., 1979), Saccharomyces (Meyerink et al., 1976), Neurospora (Free et al., 1979) und Dictyostelium (Taylor et al., 1977) vorgenommen. Die Größe der Repeating-Unit reicht von $5{,}8 \times 10^6$ Dalton (Saccharomyces) bis 28×10^6 Dalton (Dictyostelium).

Bei einigen Organismen wurden größere Sequenzheterogenitäten innterhalb des rDNS-Genclusters gefunden, vor allem in den nichttranskribierten Spacerregionen von Xenopus (Botchan et al., 1977). Eine inserierte 28 S Sequenz innerhalb einer rDNS-Repeating-Unit wurde bei Drosophila beschrieben (Glover and Hogness, 1977).

Für Tetrahymena und Physarum konnte gezeigt werden, daß die rDNS extrachromosomal in Form von Palindromen organisiert ist (Engberg et al., 1976, Campbell et al., 1979).

Die DNS-Sequenzen, die für die 5 S rRNS codieren sind bei den höheren Eukaryonten nicht der rDNS-Repeating-Unit angeordnet. Bei zwei niederen Eukaryonten z.B. Saccharomyces (Bell et al., 1977) und Dictyostelium (Maizels, 1976) wurde jedoch nachgewiesen, daß die 5 S rRNS-Gene innerhalb der 17 S-und 25 S-rDNS-Repeating-Unit lokalisiert ist. Dies gilt nicht für alle niederen Eukaryonten; bei Neurospora (Free et al., 1979) konnte definitiv nachgewiesen werden, daß die 5 S rRNS-Gene außerhalb der rDNS-Repeating-Unit lokalisiert sind.

Bei höheren Pflanzen liegt meistens ein höherer Reiterationsgrad für die rDNS-Repeating-Unit vor. Während bei höheren tierischen Organismen ein Reiterationsgrad von einigen Hundert Genkopien pro haploiden Genom vorliegen, beträgt der Anteil der rDNS bei höheren Pflanzen einige Tausend Genkopien pro haploidem Genom. Über die Organisation der ribosomalen Cistrons bei höheren Pflanzen ist weniger bekannt. Von Glycine max, (Sojabohne), Raphanus sativus (Rettich) und Oryza sativa (Reis) liegen Arbeiten über die Genstruktur vor (Friedrich et al., 1979; Delseny et al., 1979; Varsanyi-Breiher et al., 1979; Oono and Sugiura, 1980).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die ribosomale DNS von mehreren höheren Pflanzen mit Restriktionsendonukleasen zu kartieren. Dabei soll versucht werden, etwaige Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Pflanzen herauszuarbeiten. Da die robosomale RNS bei den verschiedenen höheren Pflanzen untereinander relativ homolog ist, wie heterologe Hybridisierungen zeigen, und die rRNS selbst strukturelle Aufgaben innerhalb des Ribosoms besitzt, sollte keine große Sequenzheterogenität innerhalb der codierenden Region angenommen werden.

Einige der beschriebenen rDNS-Repeating-Units aus tierischen Zellen sind in E. coli kloniert worden (Free et al., 1979, Glover and Hogness, 1977; Blin et al., 1979; Grummt et al., 1979). Die Klonierung einer Repeating-Unit erlaubt eine genauere Untersuchung zur Struktur und Funktion des Gens. Klonierte Gensequenzen ermöglichen die Identifizierung und direkte Lokalisierung von Kontroll- und Regulationssequenzen innerhalb dieses Gens. Eine Aufgabenstellung innerhalb dieser Arbeit besteht

in der Klonierung der rDNS-Repeating-Unit der Sojabohne und der Identifizierung einer Promotor-ähnlichen Region.

Ausgehend von der Charakterisierung repetitiver Gene und speziell der rRNS-Gene, wird anschließend untersucht, ob die Nachweisgrenze der verwendeten Methoden ausreicht, um auch Strukturgene des Pflanzengenoms zu charakterisieren, die einen niedrigeren Repetitionsgrad besitzen oder sogar zu den Unique-Sequenzen gehören.

2. Material und Methoden

2.1. Isolierung und Anreicherung von pflanzlicher rDNS

2.1.1. Puffer und Lösungen

1x Bst- Inkubationspuffer:
100 mM Tris-HCl, pH 7,6
100 mM NaCl
100 mM $MgCl_2$

1x Eco RI-Inkubationspuffer:
100 mM Tris-HCl, pH 7,6
100 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$

1x Hind III-Inkubationspuffer:
60 mM NaCl
7 mM $MgCl_2$
7 mM Tris-HCl, pH 7,4

Stop-Mix: 5% SDS
50% Glycerin
0,025% Bromphenolblau

1x Elektrophorese-Puffer:

0,036 M Tris-Cl
0,030 M NaH_2PO_4
0,002 M EDTA, pH 7,5

Denaturierungsmedium:

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisationsmedium:

3,0 M NaCl
0,5 M Tris-HCl, pH 7,5

Extraktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM $MgCl_2$
20 mM KCl
0,01% 2-Mercaptoäthanol
250 mM Saccharose

Gradientenpuffer I: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
5 mM $MgCl_2$
500 mM KCl

Gradientenpuffer II:

100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH 8,0

Reaktionsmix I: 5×10^{-6} M KJ
5×10^{-6} M NaAc/HAc, pH 5,1
5×10^{-4} M $TlCl_3$
500 µg RNS pro Ansatz
1,2 - 2,0 mCi ^{125}Jod pro Ansatz

Reaktionsmix II: 1 M $NH_4^+CH_3COO^-$ / 1M NH_4OH pH 9,7

1x SSC: 0,150 M NaCl
0,015 M Na-Citrat, pH 7,0

20x SSC: 3,0 M NaCl
0,3 Na-Citrat

2.1.2. Anzucht des pflanzlichen Materials

Phaseolus aureus, Brassica pekinensis, var. Granat und Honkong, Matthiola incana und Cucumis melo wurden unter sterilen Bedingungen angezogen. Die Keimlinge wurden zwischen dem 6. und 8. Tag geerntet und für die DNS-Isolierung verwendet.

2.1.3. DNS-Isolierung und CsCl-Actinomycin D-Gradienten

Die DNS wurde nach der Methode von Hemleben et al. (1975) isoliert. Neutrale CsCl-und CsCl-Actinomycin D-Gradienten wurden nach der Methode von Hemleben et al. (1977) hergestellt.

2.1.4. Restriktionsenzymabbau

Die angereicherte rDNS wurde mit Eco RI-Restriktionsendonuklease (Sigma, München), BstI-Restriktionsendonuklease (Geschenk von Dr. Richard B. Meagher, Athens Georgia, U.S.A.) und Hind III-Restriktionsendonuklease (Boehringer, Mannheim) unter folgenden Bedingungen

abgebaut:

Einzelabbau: Jeweils 2 µg angereicherte rDNS wurden in 1x Bst I - bzw. Eco RI - oder Hind III-Inkubationspuffer gelöst und mit 10 Enzymeinheiten Restriktionsendonuklease 2 Std. bei 37° C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Die Reaktion wurde mit 5 µl Stopmix abgestoppt.

Doppelabbau: Der erste Abbau wurde analog dem Einzelabbau in 50 µl Inkubationsvolumen durchgeführt. Beim Wechsel zum nächsten Enzym wurde entsprechend den Inkubationsbedingungen für die einzelnen Enzyme Puffer des ersten Enzyms durch Zugabe von H_2O ausverdünnt (Übergang von Eco RI zu Hind III) oder 1/10 Volumen an 10x Inkubationspuffer des zweiten Enzyms zugesetzt (Übergang von Hind III zu Eco RI). Das zweite Restriktionsenzym wurde ebenfalls in einer Konzentration von 10 Enzymeinheiten pro Ansatz inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10µl Stopmix beendet.

2.1.5. Agarosegelelektrophorese der abgebauten rDNS

Die Agaroseplattengele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen. Am unteren Ende der Gelapparatur wurde ein 2 cm langer Polyacrylamidblock als Abschluß polymerisiert. Darauf wurde das Agarosegel (aufgekocht in 1x E-Puffer) bei 65°C gegossen.

Das fertige Agarosegel hatte ein Ausmaß von 17 x 16 x 0,3 cm. Die abgebauten DNS-Proben wurden

auf das Gel aufgetragen. Nach einer Startelektrophorese von 10 min bei 150 mA wurde über Nacht bei 40 V und zirkulierendem Puffer elektrophoretisch getrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde λ-DNS verwendet, die entweder mit Hind III oder Eco RI abgebaut worden war.

2.1.6. Eluierung der DNS aus Agarosegelen (nach Southern, 1975)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in Aethidiumbromidlösung (0,2 µg/ml) etwa 30 Minuten lang gefärbt, über einer kurzwelligen UV-Betrachtungsbox fotografiert und dann in Doppelgeltaschenstreifen geschnitten. Die Gelstreifen wurden in Denaturierungsmedium für 30-40 min leicht schüttelnd bewegt, zweimal mit dest. H_2O gewaschen und dann für 50-60 min in Neutralisationsmedium bewegt. Danach wurden die Gelstreifen auf Nitrocellulosefilter nach Southern (1975) über Nacht eluiert (ausführliche Darstellung der Elution, s. Diplomarbeit H. Friedrich 1978, Tübingen).

2.1.7. Isolierung und Jodierung von ribosomaler RNS aus Sojabohnen

Sojabohnen (Glycine max. Varietät "Wayne"/Noble Brothers Seed Company, Gibson City, Illinois U.S.A.) wurden angezogen und mit 2,4 - Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 -D, 10^{-3}M) besprüht, wie von Guilfoyle et al. (1976) beschrieben. Die 5 Tage

alten Hypokotyle wurden geerntet, in 0,5 cm Stücke geschnitten und zwei Stunden lang in H_2O mit Stickstoff begast. Die Begasung führt zur Dissoziation der Polysomen in Monosomen (Lin & Key, 1971). Das destilierte H_2O wurde abgegossen, das Gewebe in Extraktionspuffer mit einem Ultra-Thurrax homogenisiert. Das Homogenat wurde durch zwei Lagen Verbandsmull gepreßt und dann in einem Sorvall SS 34-Rotor bei 9 000 Upm 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Beckman Ti 60-Rotor bei 45 000 Upm und 4°C 90 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml Gradientenpuffer I aufgenommen und im Ti 60 Rotor bei 5 000 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und 75 OD_{260}-Einheiten jeweils auf einen 38,5 ml linearen Saccharosegradienten (15 - 33% in Gradientenpuffer I) aufgeschichtet. Die Gradienten wurden 18 Std. bei 20 000 Upm und 4°C im SW 27 Rotor (Beckman) zentrifugiert und anschließend mit einer Gilford-Flow-Cel-Apparatur (Meßbereich 260 nm) fraktioniert. Die Fraktionen, die die 40 S und 60 S Untereinheit enthielten, wurden getrennt vereinigt, phenolextrahiert und mit 96%igem Äthanol präzipitiert.

Die präzipitierte RNS wurde in Gradientenpuffer II gelöst und auf einen 18 ml exponentiellen Saccharose-Gradienten (0,3 M - 1,4 M Saccharose in Gradientenpuffer II) aufgetragen. Die Gradienten wurden in einem Beckman SW 41 Rotor bei 4 000 Upm 16 Std. bei 4°C zentrifugiert, anschließend fraktioniert und die Fraktionen der 5 S, 18 S und 25 S rRNS getrennt vereinigt. Die vereinigten rRNS-Spezies wurden über Nacht gegen Gradientenpuffer II dialysiert und dann

mit 96%igem Äthanol ausgefällt.

Die drei rRNS-Spezies wurden in dest. H_2O dialysiert und in die In-vitro-Markierung mit ^{125}Jod eingesetzt (Getz et al. 1972). Die Reaktion mit ^{125}Jod erfolgte für 20 min bei 60°C in Reaktionsmix I (2ml Volumen); dann wurde die Inkubation unterbrochen, auf Eis abgekühlt, 1/20 Volumen (= 0,1 ml) 0,1 M Na_2SO_3 und dann 0,15 ml Reaktionsmix II zugegeben und bei 60°C für 20 min inkubiert. Die markierte rRNS wurde von nicht-reagiertem Jod über eine Sephadex G-25 (fine) Säule abgetrennt. Die vereinigten ^{125}J-rRNS-Fraktionen wurden 1 Std. mit Pronase (20 µl/ml) bei 37°C inkubiert, phenolextrahiert und dann ausgefällt (eine ausführliche Darstellung der Jodierung s. Diplomarbeit H. Friedrich 1978, Tübingen).

2.1.8. Hybridisierung der Southern-Blots

Die Filterstreifen wurden in 25% Formamid, 6x SSC mit 0,2 µg/ml ^{125}J-rRNS für 16-18 Std bei 60°C inkubiert. Nach Abschluß der Hybridisierung wurden die Filter je dreimal 20 min in 2x SSC bei 20°C gewaschen, 1 Std. in 2x SSC bei 20°C mit RNAse (20 µg/ml) inkubiert und abermals dreimal in 2x SSC je 20 min gewaschen.

2.2. Klonierung von angereicherter rDNS

2.2.1. Puffer und Lösungen

1x Elektrophoresepuffer (Tris-Borat):

0,090 M Tris-HCl, pH 8,0
0,005 M Na_2EDTA
0,090 M Borsäure

10x Ligase-Puffer:

0,200 M Tris-HCl, pH 7,6
0,066 M $MgCl_2$
0,100 M DTT

100x ATP-Mix:

0,020 M ATP pH 7,5

Luria-Broth-Ampicillin-Platten,
Luria-Broth-Tetracyclin-Platten:

Bacto-Tryptone	10g
Yeast-Extract	5g
NaCl	10g
Agar	20g
H_2O	1l

autoklavieren 30 min, 121°C,
dann abkühlen lassen auf 60°C,
Zugabe von 2 mg/l Ampicillin,
bzw. Zugabe von 1,5 mg/l Tetracyclin.

Luria-Broth-Medium:

Bacto-Tryptone	10g	
Yeast-Extract	5g	
NaCl	10g	pH 7,0
H_2O	1l	

autoklavieren: 20 min, 121°C

Luria-Broth-Ampicillin-Medium:

Bacto-Tryptone	10g	
Yeast-Extract	5g	
NaCl	10g	pH 7,0
H_2O	1l	

autoklavieren: 20 min, 121°C
abkühlen auf 60°C
Zugabe: 2mg/l Ampicillin

Brain-Heart-Infusion: (Fertigmedium der Fa. Difco)

Schnellnachweis:

a) Lyse-Puffer I:
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
25% Saccharose

b) Lysozymlösung:
5 mg/ml Lysozym (Fa. Sigma)
in 0,025 M Tris-HCl, pH 8,0

c) EDTA-Lösung:
0,25 M Na_2EDTA, pH 8,0

d) Triton-Lysis-Mix:
0,33% Triton X-100
0,20 M Na_2EDTA, pH 8,0
0,15 M Tris-HCl, pH 8,0

Isolierung von Plasmid-DNS im Großansatz

a) Lyse-Puffer II:
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
20% Saccharose

b) EDTA-Lösung:
0,25 M Na_2EDTA, pH 8,0

c) NaCl-Lösung: 5M NaCl

d) SDS-Lösung: 20% SDS

Propidiumjodidlösung:
2 mg/ml PdJ in 5%iger äthanolischer Lösung

M 9 Medium (Plasmid-Amplifizierungsmedium):

a)

20% Saccharoselösung	20ml
0,01 M $CaCl_2$-Lösung	10ml
0,10 M Mg SO_4	10ml
20% Casaminoacidlösung	20ml
H_2O	850ml

autoklavieren: 20 min, 121°C
abkühlen lassen auf 60°C
Zugabe: Salzlösung (10 fach) 100 ml

b) Salzlösung (10 fach)

$Na_2 H PO_4$	85g
$KH_2 PO_4$	17g
NaCl	5g
NH_4Cl	10g
H_2O	1 000ml

autoklavieren: 20 min, 121°C
abkühlen lassen auf 60°C,
Zugabe zu a)

Equilibrierungspuffer (für Dowex-Säule):

0,1M Tris-HCl, pH 8,0
0,5M NaCl

2.2.2. Herstellung einer großen Menge unvollständig abgebauter DNS

8 mg Sojabohnen DNS wurden auf eine Endkonzentration von 0,1 mg/ml in 1x Bst I Inkubationspuffer verdünnt. Diese Lösung wurde mit 500 Enzymeinheiten der Restriktionsendonuklease Bst I 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNS-Lösung wurde danach zweimal phenolextrahiert und anschließend viermal ätherextrahiert. Nach Entfernung der letzten Ätherphase wurde die DNS mit zwei Volumina 96%igem Äthanols über Nacht ausgefällt.

Das Präzipitat wurde in 10 ml 1x E-Puffer (Tris-Borat) gelöst und auf die präparative Elektrophorese aufgetragen.

2.2.3. Präparative Agarosegelelektrophorese

Eine Lösung von 700 ml 1x E-Puffer, die 7 g Agarose enthält, wurde 10 min autoklaviert, auf 65°C abgekühlt, und vorsichtig in die Gießform der Radialelektrophorese gegossen. Nach Abkühlen und Erstarren des Gels wurden die Elektroden der Apparatur angeschlossen und die Elektrodenräume und Puffervorratsräume mit 1x E-Puffer aufgefüllt (genauere, ausführliche Beschreibung s. Diplomarbeit H. Friedrich 1978, Tübingen). Die DNS-Probe des unvollständigen Abbaus wurde im Probenkanal aufgetragen und 2 1/2 Tage lang elektrophoretisch aufgetrennt bei 30 V und 140 mA. Fraktioniert wurde alle 20 min (8 ml Volumen).

2.2.4. Hybridisierung der Fraktionen aus der präparativen Elektrophorese mit ^{125}Jod- rRNS

0,6 ml einer jeden Fraktion wurden in einem Reagenzglas mit 0,6 ml Denaturierungsmedium bei Raumtemperatur eine halbe Stunde lang inkubiert. Dann wurden 2,5 ml Neutralisationsmedium zugegeben und die neutralisierte Lösung jeweils sofort in einen Zylinder gekippt, an dessen unterem offenen Ende ein Milliporefilter (Nitrozellulose) fest eingespannt war. Die Lösung wurde langsam durchtropfen gelassen. Die Filter wurden erst 1 Std. bei 20°C und dann 2 Std. bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Danch wurden die Filter gemeinsam in einem Szintillationsgläschen mit ^{125}Jod markierter Soja rRNS in 25% Formamid, 6x SSC für 5 Std. bei 60°C inkubiert. Die Filter wurden anschließend 3x in 2x SSC bei Raumtemperatur gewaschen, 1 Std. mit RNAse inkubiert (20 µg/ml) und dann nochmals 3x in 2x SSC gewaschen. Abschließend wurden die Filter unter einer Infrarotlampe getrocknet und in PPO/POPOP-Tolutol Szintillator im Szintillationszähler gemessen.

2.2.5. Ligation der rRNS-Fraktion mit dem Resistenzplasmid pBR 322

Von der Fraktion, die am stärksten mit ^{125}J- rRNS hybridisiert hatte ($3{,}8 \times 10^{-6}$ Dalton) wurden 50 µl entnommen. Zehn µg DNS der $3{,}8 \times 10^{-6}$ Dalton großen Soja-DNS-Bande wurden in einem Ligationsschritt mit pBR 322 eingesetzt:

Dazu wurden 3,5 µg pBR 322-DNS mit 10 Enzymeinheiten der Restriktionsendonuklease Bst I über Nacht bei 37°C in 1x Bst I-Inkubationspuffer inkubiert. Die DNS wurde danach phenolextrahiert, viermal ätherextrahiert, und mit Äthanol über Nacht ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 40 µl H_2O aufgenommen und die 10 µg Soja-DNS ($3,8 \times 10^6$ Dalton) zugegeben. Dann wurden 1/10 Volumen ATP-Mix zugegeben. Mit H_2O wurde auf ein Gesamtvolumen von 0,2 ml aufgefüllt und 40 Enzymeinheiten T_4-Ligase zugegeben. Es wurde 16 Std. bei 12°C inkubiert. Bei Start und Beendigung der Inkubation wurden jeweils 10 µl aus dem Inkubationsvolumen entnommen und 10 µl Stop-Mix zugegeben. Diese Proben wurden über ein 1%iges Agarosegel mit λ-abgebauter DNS als Marker aufgetrennt.

Der Rest des Inkubationsmixes, d.h. die ligierte DNS wurde über Nacht gegen 0,01 M Tris-HCl, pH 7,6 dialysiert.

2.2.6. Transformation

0,2 ml einer frischen Übernachtkultur des Rezipientenstammes E. Coli HB 101 wurden in 10 ml frisches Luria-Broth-Medium transferiert und bei 37°C und 120 Upm geschüttelt. Nach ungefähr 2 h war eine Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml vorhanden. Die Zellen wurden in jeweils 5 ml Portionen sterile 50 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen überführt und in einer Beckman-Kühlzentrifuge in einem Ja 20-Rotor bei 5 000 Upm und 4°C 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml sterile 4°C kalte 10 mM NaCl-Lösung aufgenommen und die Zellen

wiederum bei 5 000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml frischer steriler 30 mM $CaCl_2$-Lösung aufgenommen und 20 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert und das Sediment in 1,1 ml 30 mM $CaCl_2$ aufgenommen. 0,2 ml dieser Suspension wurden in ein steriles Reagenzglas überführt und 0,1 ml des Ligaseinkubationsmixes (pBR 322-DNS ligiert mit Soja-DNS) zugegeben. Dieses Gemisch wurde 1 h im Eisbad inkubiert. Danach wurde die Inkubationslösung für 1 min bei 42°C in einem Wärmeblock inkubiert und anschließend sofort 2 ml Luria-Broth zugegeben. Die Zellsuspension wurde dann eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden je 0,1 ml der Lösung auf Luria-Broth-Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.7. Screening der Transformanten

Die am nächsten Tag herangewachsenen "Transformanten wurden jeweils einzeln von der Masterplatte" abgeimpft und jeweils auf eine Tetracyclin- und dann auf eine Ampicillin-Platte ausgestrichen. Es wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Dieser Test zeigte, wieviele der isolierten Transformanten auch Rekombinanten sind: Jede Kolonie, die auf Ampicillin-Platten wächst, aber nicht auf Tetracyclin-Platten ist ein rekombinanter Klon. Die Tetracyclin-Region wird durch Insertion von artfremder DNS in die Bst I - Schnittstelle innerhalb des Gens zerstört.

Die identifizierten Klone wurden in jeweils ein Probenloch einer Mikroliterplatte (in Luria-Broth-Ampicillin-Medium) angeimpft.

2.2.8. Koloniehybridisierung

Die Mikrotiterplatte wurde unter leichtem Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit einer Stempelapparatur jeweils die gesamten 96 Proben der Mikrotiterplatte mit einem Schritt auf jeweils 1 Luria-Broth-Agar enthaltende Petrischale geimpft (15 cm Durchmesser), auf denen jeweils ein Millipore-Nitrocellulosestreifen lag, der nach den Abmaßen der Mikrotiterplatte geschnitten war. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach etwa 24 Std. hatten sich jeweils Kolonien auf dem Millporefilter ausgebildet. Der Millporefilter wurde vorsichtig vom Agar genommen und in einer großen Petrischale auf einer 0,5 M NaOH-Lösung 7 min lang geflutet. Danach wurde der Filter auf Fließpapier getrocknet und dann 5 min auf einer Lösung von 1,0 M Tris pH 8,0 geflutet. Dann wurde der Filter auf das Neutralisationsmedium II und abschließend 5 min auf 2x SSC-Lösung überführt. Danach wurden die Filter auf Fließpapier getrocknet in Äthanol gewaschen, 2 Std. an der Luft und schließlich 3 Std. unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Die getrockneten Filter wurden dann 16 Std. bei 60°C in 25% Formamid, 6x SSC und 0,2 µg/ml ^{125}J-rRNS hybridisiert.

2.2.9. Cycloserin-Anreicherungsmethode

0,2 ml der Transformationslösung wurden in 10 ml frisches Luria-Broth pipettiert und 2 Std. bei 37°C geschüttelt. Danach wurden 0,020 ml einer Tetracyclin-Lösung (5 mg/ml) zugegeben und eine weitere Stunde geschüttelt. Die Zellen wurden bei 5 000 Upm und 4°C abzentrifugiert und in 100 ml Luria-Broth resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden jeweils 0,1 ml auf eine Luria-Broth-Ampicillin-Platte ausplattiert und wie unter 2.2.9. gescreent.

2.2.10. Schnellnachweis und Charakterisierung der Plasmid-DNS

Die zu untersuchenden Klone wurden jeweils einzeln in 5 ml Brain-Heart- Infusion angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag in einem Polyprophylenzentrifugenröhrchen mit einem Beckman-Rotor JA 20 in einer Beckman-Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde kurz bei - 20°C tiefgefroren und dann bei 0°-4°C in 1,0 ml Puffer I suspendiert. Dann erfolgte eine Zugabe von 0,2 ml Lysozymlösung und 0,05 ml EDTA-Lösung. Die Suspension wurde 20 min bei 4°C inkubiert und 5 µl RNAse-Lösung (10mg/ml) zugegeben. Dann wurden 0,4 ml des Triton-Lysis-Mixes zugeführt und weitere 3 min bei 0°C inkubiert.
Die Lysis konnte innerhalb der nächsten 30-40 sec beobachtet werden. Das Lysat wurde bei 17 000 Upm und 4°C in einem Sorvall SS 34-Rotor 60 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde in je ein 15 ml Corex-Zentrifugenglas gegossen und 1,25 ml H_2O zugegeben (um die Saccharose zu verdünnen). Dann erfolgte die Zugabe von 2-5 ml puffergesättigte Phenol. Das Zentrifugenglas wurde dreimal invertiert und dann 15 min bei 4°C und 2 000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 2 Volumen Äthanol und Natriumacetat (0,5 M Endkonzentration) ausgefällt. Die präzipitierte DNS wurde am nächsten Tag abzentrifugiert, getrocknet und in 20 mM Tris pH 7,5 aufgenommen. Diese DNS kann für Screening und Restriktionsenzymabbau verwendet werden.

2.2.11. Anzucht und Isolierung von Plasmid DNS im Liter Maßstab

Eine Kolonie wurde in 50 ml Luria-Broth angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde in 1 l M9-Medium überimpft. Es wurde von jeder heranwachsenden Kultur eine Wachstumskurve mit einem Klett-Photometer (600nm, Bausch und Lomb) aufgenommen. Bei einem Klettwert von 70 wurden 150 mg Chloramphenicol zugegeben und die Kultur weitere 16 Std. geschüttelt. Danach wurden die Zellen bei 5 000 Upm und 4°C in einem Sorvall GS 3-Rotor abzentrifugiert und in einem Gesamtvolumen von 18 ml Lyse-Puffer II suspendiert. Die Suspension wurde in ein Backman Ti-60-Polycarbonat-Röhrchen gegeben und in einem Eisbad inkubiert. 5,0 mg Lysozym (als Trockensubstanz) wurden zugegeben, dann 2,0 ml EDTA-Lösung und für 15 Minuten bei 0°-4°C inkubiert. Dann wurden je 2,0 ml NaCl-Lösung zugegeben und 1,0 ml SDS-Lösung

wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig vom Boden des Zentrifugenglases aus zugegeben. Die SDS-Lösung wurde dabei durch die gesamte Suspension geblubbert. Dieser Vorgang erstreckte sich über einen Zeitraum von etwa 3 sec. Es wurden weitere 5 min bei 0^{o}-4^{o}C inkubiert und dann 45 min bei 4^{o}C und 34 000 Upm im Beckman-Ti-60-Rotor zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig in ein Corex-Zentrifugenglas abgegossen und dazu 10 ml H_2O (um die Dichte der wässrigen Lösung herabzusetzen) und 15 ml puffergesättigtes Phenol zugegeben. Die Corex-Gläser wurden jeweils dreimal invertiert (nicht geschüttelt) und dann 20 min bei 8 000 Upm in einem Sorvall SS 34 Rotor zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein 250 ml Sorvallbecher gefüllt und mit 2 Volumen 96% Äthanol und Natriumacetat (Endkonzentration 0,3 M) über Nacht ausgefällt.

2.2.12. Propidiumjodid-CsCl-Gradienten

Die ausgefällte DNS wurde in einem Sorvall GSA-Rotor abzentrifugiert, getrocknet und in dest. H_2O wieder aufgenommen. Zu 5,5g CsCl wurden 4,875 ml DNS-Lösung zupipettiert (max. 3 mg DNS) und 0,75 ml Propidiumjodidlösung zugegeben. Diese Lösung wurde in jeweils ein Beckman Polycarbonatröhrchen (Rotor 50 Ti) eingefüllt, mit Paraffinöl überschichtet und bei 43 000 Upm und 20^{o}C für 20-24 Std. zentrifugiert.

Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Gradienten von der Seite mit einer kurzwelligen UV-Lampe angestrahlt. Mit Hilfe einer Anstech- und Austropfvor-

richtung (Beckman) wurden die Gradienten fraktioniert. Die flouroszierenden DNS-Banden wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Die DNS-Lösung wurde auf eine Säule mit Dowex 50 W (0,5 g/in Equlibrierungspuffer gequollen) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Die DNS wurde über Nacht gegen 20 mM Tris, pH 8,0 dialysiert.

2.2.13 Charakterisierung der klonierten DNS

Jeweils 2 µg der Plasmid-DNS wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen abgebaut (s.2.1.4.), über 1%ige Agarosegele (s.2.1.5.) aufgetrennt, nach Southern eluiert (s.2.1.6.) und hybridisiert (s.2.1.8.).

2.3. "Tailing" von angereicherter rDNS und pBR 322-DNS und anschließende Klonierung

2.3.1. Puffer und Lösungen

10x Tailing-Puffer:
1,4 M Dimethyl-arsenige Säure
0,3 M Tris-HCL
1,1 M KOH

1x Pst-Inkubationspuffer:
0,050 M NaCl
0,006 M Tris HCl, pH 7,4
0,006 M $MgCl_2$
0,006 M β-Mercaptoäthanol
1 mg/ml Serumalbumin

10x Annealing-Puffer:
0,010 M Tris-HCL, pH 7,4
0,003 M EDTA
0,200 M NaCl

MOPS-RbCl-Puffer:
0,010 M MOPS (Fa. Sigma), pH 7,0
0,01o M RbCl
die Lösung wurde steril filtriert, nicht autoklaviert

MOPS-RbCl-$CaCl_2$-Puffer:
0,100 M MOPS, pH 6,5
0,010 M RbCl
0,050 M $CaCl_2$

2.3.2. Anreicherung der rDNS

Sojabohnen wurden nach 2.1.7. angezogen und die rDNS über CsCl-Actinomycin D-Gradienten nach 2.1.3. angereichert.

2.3.3."Tailing"der angereicherten Soja rDNS

1,0 µg rDNS (Hind III abgebaut)	7,0 µl
H_2O	27,4 µl
10x Tailing-Puffer	5,0 µl
50 µl ^{3}H-d-CTP (NEN-stock) getrocknet und aufgenommen in	
10 mM CTP	0,5 µl
10 mM $CoCl_2$	5,0 µl
terminale Transferase (Fa. Böhringer)	0,1 µl
5 mM DTT	5,0 µl

Inkubation: 10 min 37°C

1 µl wurde nach Beendigung der Reaktion aus dem Gemisch entnommen, auf einen Whatman DE 81-Filter pipettiert und eingetrocknet. Der Filter wurde dann dreimal 15 Minuten in Phosphat-Puffer (0,5 M Na_2PO_4) danach einmal in Athanol gewaschen und unter einer Infrarotlampe getrocknet. Die Länge des anpolymerisierten einzelsträngigen Polynukleolidstranges wurde aus der inkorporierten Aktivität bestimmt. Es wurde nur "getailte" rDNS weiterverwendet, deren synthetisierter oligo dC-Strang zwischen 15 und 20 Nukleotiden lang war.

Das Reaktionsgemisch wurde im Eppendorf-Reaktionsgefäß zweimal phenolextrahiert, anschließend dreimal ätherextrahiert und dann mit 2 Volumina Äthanol ausgefällt.

2.3.4. Pst I-Abbau des Resistenzplasmids pBR 322

10 µg pBR 322-DNS wurden nach folgendem Pipettierschema mit der Restriktionsendonuklease Pst I abgebaut:

10 µg pBR 322-DNS	15 µl
10x Pst I-Puffer	11 µl
H_2O	84 µl
Pst I	1 µl

Inkubation: 6 Std., 37°C

Vor dem Start der Reaktion und am Ende wurden jeweils 2 µl aus dem Inkubationsgemisch entnommen. Diese Proben wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und dienten zur Bestimmung des kompletten Abbaus der pBR 322-DNS mit der Restriktionsendonuklease Pst I. Es wurde nur vollständig abgebaute DNS für das anschließende Tailing- und Annealing-Experiment verwendet.

2.3.5. "Tailing" der abgebauten pBR 322-DNS
(Rougeon et al, 1975)

8 µg Pst I abgebaute pBR 322-DNS wurden nach folgendem Pipettierschema mit der terminalen Transferase inkubiert:

8 µg Pst I abgebaute pBR 322-DNS	138 µl
10x Tailing-Puffer	18 µl
10 mM GTP	2 µl
10 mM $CoCl_2$	20 µl
terminale Transferase	0,4 µl
H_2O	1,6 µl

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch zweimal phenolextrahiert, anschließend dreimal ätherextrahiert und schließlich mit zwei Volumina Äthanol ausgefällt. Alle diese Manipulationen wurden im Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt.

2.3.6. "Annealing"-Reaktion (=Verknüpfung)

100 ng Plasmid-DNS (Pst I-abgebaut und oligo-dG getailed) und 1000 ng Sojabohnen rDNS (Hind III-abgebaut und oligo-dC-getailed) wurden in Annealingpuffer 15 min bei 70°C, dann 60 min bei 50°C, 60 min bei 37°C und 60 min bei 23°C inkubiert.

2.3.7. Überprüfung der"Annealing"-Reaktion

10 µl der Inkubationslösung wurden jeweils zu Beginn und am Ende der Reaktion entnommen, auf jeweils einen Saccharosegradienten (5-50% in 0,005 M Tris-HCl pH 7,6) aufgetragen und mit einem Beckman SW-65-Ti-Rotor bei 50 000 Upm und 4°C 3 Std. zentrifugiert. Es wurde in 150 µl Fraktionen fraktioniert. 100 µl einer jeden Fraktion wurden auf ein Whatman DE 81 Filter pipettiert und eintrocknen gelassen. Dann

wurden die Filter dreimal in 0,5 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 und anschließend in Äthanol gewaschen. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Szintillationszähler.

2.3.8. Transformation (nach Kushner et al., 1979)

Hinweis: Alle Experimente des Klonierens, einschließlich der Anzucht rekombinanter Klone, wurden unter P3-Sicherheitsbedingungen in einem Kloning-Spezial-Labor von Dr. R.B. Meagher University of Georgia U.S.A. durchgeführt.

Der Rezipientenstamm E.Coli SK 1590 wurde einen Tag vor der Transformation auf eine Luria-Broth-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Morgen wurden 50 ml Luria-Broth-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft (s.2.2.1). Das Wachstum der Zellen wurde mit einem Klett-Photometer (600 nm Bausch und Lomb) verfolgt. Bei einem Klett von 20 wurden 2 ml bzw. 5 ml oder 10 ml der Zellen in sterile 15 ml Corex-Zentrifugengläser gefüllt und bei 8 000 Upm und 4°C 10 min in einer Beckman J-21-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Sedimente wurden in 1 ml bzw 2,5 oder 5 ml MOPS/RbCl-Puffer aufgenommen und sehr vorsichtig suspendiert. Danach wurde wiederum 10 min bei 8 000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort nach Stillstand des Rotors abgegossen. Das Sediment wurde in 1 ml bzw 2,5 ml oder 5 ml MOPS/RbCl/$CaCl_2$-Puffer aufgenommen und für 30 min im Eisbad inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 43,5°C (im Temperaturblock). Es wurde danach kurz

geschüttelt und 4,8 ml steril-filtriertes Luria-Broth-Medium zugegeben. Abschließend wurde bei 37°C für 1 Std. inkubiert und dann auf Luria-Broth-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.3.9. Weiterverarbeitung der Transformanten

Das Screening auf rekombinante Klone erfolgte, wie unter 2,2.9., die Koloniehybridisierung wie unter 2.2.10 beschrieben.

2.4. Klonierung von nicht-angereicherter rDNS

2.4.1. Puffer und Lösungen

10 x T_4-Ligase-Puffer:

0,200 M Tris-HCl, pH 7,6
0,066 M $MgCl_2$
0,100 M DTT (Fa. Sigma)

100 x ATP-Mix:

0,020 M ATP, pH 7,5

2.4.2. Hind III-Abbau von pBR 322

10 µg pBR 322-Plasmid-DNS wurden mit 20 Enzymeinheiten der Restriktionsendonuklease Hind III über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Inkubationsbeendigung wurde 1 µg entnommen und über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt. Dies diente zur Bestimmung des vollständigen Abbaus. Der Rest des Inkubationsgemisches wurde im Eppendorfreaktionsgefäß phenolextrahiert und anschließend dreimal ätherextrahiert.

2.4.3. Alkalische Phosphatase-Behandlung des abgebauten Plasmids

Die ätherextrahierte pBR 322 Hind III abgebaute DNS wurde mit alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim) behandelt, um eine Selbstreassoziation des Plasmids unter T_4-Ligase-Katalyse zu verhindern. Dazu wurden 40 µl alkalische Phosphatase (= 75 Units) einer Eppendorf-Zentrifuge 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 5 µl 10 mM Tris, pH 8,0, aufgenommen. Diese 5 µl wurden zu der obigen pBR 322-DNS-Lösung gegeben und dann zwei Stunden bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde phenolextrahiert und viermal ätherextrahiert.

2.4.4. Hind III-Abbau der Sojabohnen-Gesamt-DNS

15 µg Soja-DNS wurden mit 50 Enzymeinheiten der Restriktionsendonuklease Hind III über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten eine Phenol-

extraktion und drei Ätherextraktionen.

2.4.5. Ligation der beiden DNS-Spezies mit T_4-Ligase

10 µl Soja-DNS (= 12 µg, Hind III-gespalten)
10 µl pBR 322-DNS (= 2 µg, " ")
450 µl H_2O
9 µl 10x T4-Ligase-Puffer
1 µl T_4-Ligase (= 10 Enzymeinheiten)
5 µl 100 x ATP-Lösung

Es wurde 18 Std. bei 12°C (beheiztes Wasserbad im Kühlraum) inkubiert.

Jeweils 8 µl wurden zu Beginn und am Ende der Inkubation entnommen, mit Stop-Mix versehen und über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, um den Erfolg der Ligation zu überprüfen.

2.4.6. Transformation, Screening und Koloniehybridisierung

Diese drei Techniken wurden wie unter 2.3.8., 2.2.9. und 2.2.10. beschrieben durchgeführt.

2.4.7. Anzucht der einzelnen rDNS-Klone

Die Anzucht der Klone pHFK 97, pHFK 206, pHFK 493, pHFK 714, pHFK 659, pHFK 578, pHFK589, pHFK 645, pHFK 657, pHFK 668, pHFK 689, pHFK 798, pHFK 799,

pHFK 800, pHFK 810, pHFK 910, pHFK 927, pHFK 938 erfolgte wie unter 2.2.13. beschrieben. Die jeweilige Plasmid-DNS wurde nach 2.2.14 isoliert.

2.4.8. Charakterisierung der rekombinanten DNS

Die DNS der einzelnen Klone wurde mit den verschiedenen Restriktionsendonukleasen wie unter 2.1.4. beschrieben abgebaut. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte über Agarosegele (2.1.5.), Elu-ierung und Hybridisierung nach 2.1.6. und 2.1.8.

2.5. Bindung von Sojabohnen-RNS-Polymerase I an geklonte Soja-rDNS

2.5.1. Puffer, Lösungen und Säulenmaterial

Puffer A:

0,050 M Tris-HCl, pH 7,9
0,001 M Na_2EDTA, pH 7,9
0,001 M DTT (Fa. Sigma)
30% Äthylenglykol

Heparin-Sepharose-Säule:

1 g CN Br-aktivivierte Sepharose 4B (Fa. Sigma) wurden in 1 mM HCl, pH 3,5 äquilibriert. Nach 15 Minuten wurde die HCl-Lösung über eine Fritte abgesaugt und die Sepharose in 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,1, aufgenommen. Dann wurden 10 mg Heparin (Grand Island Biological Comp.) zugegeben und für 2 Std. vorsichtig gerührt. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem die Kupplungslösung abgesaugt wurde und durch eine 0,1 M Glycin-Lösung, pH 9,1, ersetzt wurde. Dann wurde abermals 4 Stunden vorsichtig gerührt und anschließend viermal mit 0,1 M Natriumacetatlösung, pH 4 gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Waschung in 0,1 M. Natriumborat, pH 8,0 und 500 mM NaCl. Zum Gebrauch wurde die Heparin-Sephorose in Puffer A äquilibriert.

Phosphocellulose (Whatman P II)-Säule:

Die Phosphocellulose wurde analog der DEAE-Cellulose mit Base und Säure äquilibriert und dann anschließend in 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$-Puffer A äquilibriert und aufbewahrt.

Agarose A-S-Säule (Fa. Biorad)

Die vorgequollene Agarose wurde über Nacht in 0,5 M $(NH_4)_2SO_4$-Puffer äquilibriert.

Mix für RNS-Polymerase I

0,05 M Tris-HCl, pH 7,5
25% Glycerin
0,0004 M ATP
0,0004 M CTP
0,0004 M UTP
0,00004M UTP
0,020 M DTT
0,001 M $MnCl_2$
0,050 M $(NH_4)_2SO_4$
100 µg/ml DNS (Fa. Sigma)
0,1 M Ci/100ml ^{3}H-UTP (NEN)

DEAE-Cellulose (Whatman DE 52)-Säule:

Die Cellulose wurde 30 min in 0,01 M KOH äquilibriert, viermal mit H_2O gewaschen, dann 30 min in 0,01 M HCl äquilibriert und aufbewahrt.

RNS-Polymerase-Bindungspuffer:

25% Glycerin
0,050 M KCl
0,010 M Tris-HCl, pH 8,0
0,010 M $MgCl_2$
0,0001 M EDTA
0,0001 M DTT

1 x Alu Inkubationspuffer:

6 mM Tris-HCl, pH 7,6
6 mM $MgCl_2$
6 mM β-Mercaptoäthanol

1 x Cfo Inkubationspuffer:

100 mM Tris-HCl, pH 7,6
10 mM $MgCl_2$

1 x Dde Inkubationspuffer:

100 mM Tris-HCl, pH 7,6
10 mM $MgCl_2$
100 mM NaCl

Acrylamidgele:
a) Stammlösung: 30g Acrylamid
0,8 g Bis
mit H_2O auf 100 ml auffüllen

b) Herstellung des Gels

30,00 ml Stammlösung
6,00 ml 1,4% Ammoniumpersulfat
0,05 ml T MED (Serva)
9,00 ml 10 x E-Puffer (s. 2.2.1.)
45,00 ml H_2O

2.5.2. Isolierung der Sojabohnen-RNS-Polymerase I

50 ml Sojabohnen-Chromatin (Präparation siehe Diplomarbeit H. Friedrich 1978, Tübingen) wurden von -70°C auf 0-4°C aufgetaut. Ein Viertel des Volumens = 12,5 ml 2,5 M $(NH_4)_2SO_4$-Lösung wurden zugegeben und 30 min bei Kühlraumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 1 Minute mit einem Ultra-Thurrax bei halber Auslastung homogenisiert und dann für weitere 1 1/2 Std. bei Kühlraumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde im Ti 60-Rotor 60 Minuten bei 55 000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Dem Überstand wurde ein Fünftel Volumen Puffer A zugegeben und dann festes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 0,35 g/ml. Es wurde wiederum 1 Std. bei 4°C gerührt und dann die Lösung durch Miracloth filtriert. Das Filtrat wurde 75 Minuten in einem Ti 60-Rotor bei 55 000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit dem Puffer A nachgewaschen (vorsichtig, das Sediment löst sich leicht ab), und in etwa 10 ml Puffer A aufgenommen. Mit einem Radiometer-Kopenhagen-Leitfähigkeitsmessers wurde die Ammoniumsulfatkonzentration exakt auf 0,5 M eingestellt. Diese Lösung wurde aufeine Agarose-A5-Biorad-Säule (1,5 m hoch, 4 cm Durchmesser) aufgetragen. Über Nacht wurde mit 0,25 M $(NH_4)_2SO_4$-Puffer A nachgewaschen und in 7 ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden einzeln mit dem In-vitro-Assay für RNS-Polymerase getestet. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und die Ammoniumkonzentration exakt auf 0,25 M eingestellt. Diese aktive Enzymlösung wurde auf eine Heparin-Sepharosesäule geladen. Zuerst wurde mit 0,25 M $(NH_4)_2SO_4$-Puffer A gewaschen und dann mit 0,75 M $(NH_4)_2SO_4$-Puffer A eluiert. Jede Fraktion

wurde mit dem In-vitro-Assay für RNS-Polymerase getestet und dann wiederum die aktiven Fraktionen vereinigt, und die Ammoniumsulfatkonzentration exakt auf 0,05 M eingestellt. Diese Lösung wurde auf eine DEAE-DE52-Whatman-Cellulose-Säule aufgetragen, mit 0,05 M $(NH_4)_2SO_4$Puffer A gewaschen und dann mit 0,125 M $(NH_4)_2SO_4$Puffer A eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden direkt auf eine Phosphocellulose-Säule geladen und mit 0,3 M $(NH_4)_2SO_4$ Puffer A eluiert. Die von dieser Säule erhaltenen aktiven Fraktionen wurden vereinigt und bei -70°C in 50% Glycerin (Endkonzentraktion) aufbewahrt.

2.5.3. Salz- und Ionenabhängigkeit der RNS-Polymerase I

Die isolierte RNS-Polymerase I wurde analog dem in 2.5.1. beschriebenen In-vitro-Enzym-Assay verschiedenen Messungen zur Bestimmung der Abhängigkeit von verschiedenen Ionen unterworfen. Zur Messung der Abhängigkeit der RNS-Polymerase von der Mg^{2+}, Mn^{2+} und NH_4^+ Abhängigkeit wurde das unter 2.5.1. angegebene Assay-Mix jeweils ohne diesen Ionenzusatz hergestellt.

2.5.4. Isolierung der Insert-DNS aus dem rDNS-Plasmid pFKM 206

200 µg reine rekombinante rDNS-Plasmid-DNS vgl. 2.4.7., wurden über Nacht mit 25 Enzymeinheiten Hind III-Restriktionsendonuklease bei 37°C inkubiert. Die gesamte Probe wurde mit einem Viertel Volumen Stop-Mix versehen und dann auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen. Nach Beendigung

der Elektrophorese wurde das Gel mit Aethidiumbromid gefärbt und unter kurzwelligem UV-Licht betrachtet. Die Bande der Sojabohnen-Insertion ($1,3 \times 10^6$ Dalton) wurde herausgeschnitten. Dieses Agarosestück wurde in einen Dialyseschlauch eingepackt und das "Gel-Schlauch-Päckchen" in ein horizontal durchgeschnittenes Agarosegel eingelegt. Es wurde dann abermals für 3-4 Std. elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Bande aus dem Gelstück heraus und in den Hohlraum zwischen Gel und Dialyseschlauch gewandert war. Dann wurde für 2 Minuten in umgekehrter Polungs-Richtung elektrophoretisch aufgetrennt und der Dialyseschlauch mitsamt dem eingeschlossenen Gel entnommen. Die Flüssigkeit im Dialyseschlauch wurde auf einen CsCl-Propidiumchlorid-Gradienten (2.2.14) gegeben, und in einem Ti 50-Rotor bei 43 000 Upm und 20°C 48 h zentrifugiert.

2.5.5. Bindungsstudien mit RNS-Polymerase I an rDNS

2 µg isolierte Insert-DNS oder rDNS-Plasmid-DNS wurden in einem Gesamtvolumen von 30-40 µl in Bindungspuffer mit 80 µg Sojabohnen-RNS-Polymerase I für unterschiedlich lange Zeitintervalle (von 2 bis 20 min) bei 28°C inkubiert. Bei Verwendung von 0,5 µg DNS wurden 20 µg Sojabohnen-RNS-Polymerase verwendet. Die Proteinkonzentration wurde durch einen Lowry-Test der von der Phosphocellulosesäule erhaltenen aktiven RNS-Polymerasefraktionen bestimmt. Dem Mengenverhältnis lag folgende Überlegung zu Grunde:

Insert von pHFK 206 - rDNS: $1,3 \times 10^6$ Dalton

RNS-Polymerase I: $0,52 \times 10^6$ Dalton

0,5 µg Insert rDNS: $2,23 \times 10^{16}$ Moleküle

20,0 µg RNS-Polymerase I: $2,33 \times 10^{18}$ Moleküle

Verhältnis:	rDNS:	Polymerase
	1 :	100

Die Inkubation wurde jeweils durch Transfer des Inkubationsgefäßes in ein Aceton-NaCl-Eisgemisch beendet. Bei - 10 bis - 8°C wurde 15 Minuten inkubiert. Dann wurden zwei Volumina H_2O zugegeben und mit 10 x Restriktionsendonuklease-Inkubationspuffer auf einfache Inkubationspufferkonzentration eingestellt. Jeweils 10 Enzymeinheiten Alu I, Cfo, Dde-Restriktionsendonuklease wurden zugegeben und dann 2 h bei 37°C inkubiert. Am Ende der Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Stopmix die Inkubation beendet und die gesamte Probe jeweils auf ein 2%iges bzw 2,5%iges Agarosegel oder ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 40 V. Danach wurde das Gel in Aethidiumbromidlösung gefärbt und auf einer UV-Box fotografiert.

2.5.6. Affinitätschromatographie von RNS-Polymerase I an rDNS-Plasmide

2.5.6.1. Herstellung der Sepharose 4B-rDNS-Säule

1g Sepharose 4 B CNBr aktiviert (Pharmacia, Uppsala) wurde 15 Minuten in 1 mM HCl gequollen und anschließend auf der Glasfritte mit der gleichen Lösung gewaschen. Dann erfolgte eine mehrmalige Waschung mit H_2O und abschließend mit 10 mM K_3PO_4, pH 8,2. Die Sepharose wurde dann in ein 30 ml Corexglas gegeben und in 5 ml 10 mM K_3PO_4 aufgenommen. 1 mg rDNS-Plasmid (pHFK 206) wurden zugegeben und dann bei Raumtemperatur über Nacht vorsichtig und langsam gerührt.

Die Reaktion wurde am nächsten Tag durch Zugabe von 10 ml 1 M Ammoniumacetat, pH 7,0 gestoppt und 2 Std. inkubiert bei Raumtemperatur.

2.5.6.2. Affinitätschromatographie

Zu 2,5 ml RNS-Polymerase I-Lösung nach Elution von der A-5-Agarose Säule, s. 2.5.2. wurden 250 µl 10 x RNS-Polymerase-Bindungspuffer gegeben und dann mit einer Pasteurpipette auf die in Polymerase-Bindungspuffer äquilibrierte Sepharose 4 B-Säule aufgetragen. Die Tropfgeschwindigkeit wurde auf 12 ml/Std eingestellt. Nachdem das aufgetragene Volumen vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde das Eluat ein zweites Mal aufgetragen und bei gleicher

Tropfgeschwindigkeit durchlaufen gelassen. Dann wurde mit 3 ml Alu I-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Gradienten von 0,1 - 1 M KCl-Alu I-Puffer (insgesamt 10 ml) eluiert. Die beschriebene Vorgehensweise ist leicht variiert nach der von Arndt-Jovin (1975) beschriebenen Methode.

2.6. Präparative Auftrennung von Sojabohnen-poly A^+- und poly A^-- RNS

2.6.1. Puffer und Lösungen

Gamborg's B 5 Medium (Gamborg et al., 1968)

a) Salz-Konzentrat I:

KNO_3	25,00g
$(NH_4)_2SO_4$	1,51g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,00g
$CaCl_2$	1,35g

mit dest. H_2O auf 3 l auffüllen

b) Salz-Konzentrat II:

$MnSO_4 \cdot H_2O$	1,000g
H_3BO_3	0,300g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,200g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,025g
$CuSO_4$	0,003g
KJ	0,075g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,003g

mit dest. H_2O auf 1 l auffüllen

c) Organisches Konzentrat:

Nicotinsäure	0,010g
Thiamin-HCl	0,100g
Pyridoxin-HCl	0,010g
i-Inosit	1,000g
dest. H_2O	100 ml

d) Phosphat-Konzentrat:

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 7,5 g

mit dest. H_2O auf 50 ml auffüllen.

e) Eisenkonzentrat:

Sequestren 330 1,120g

dest. H_2O 200ml

Sequestren 330 = Natrium-Ferridiäthylen-triaminpentaacetat (Fa. Geigy Chem. Company, Agricultural Devision, N.Y.)

f) 2,4-D-Lösung:

2,4-D-Lösung (0,2 mg/ml) , pH 5,5

2,4-D = 2,4 D-Dichlorphenoxyessigsäure

g) Ansetzen des Gamborg B 5 Mediums:

Salz-Konzentrat I	250ml
Salz-Konzentrat II	10 ml
Organisches Konzentrat	10 ml
Phosphat-Konzentrat	1 ml
Eisenkonzentrat	5 ml
Saccharose	20 g

mit dest. H_2O auf 1 l auffüllen

mit 0,1 N KOH auf pH 5,7 einstellen

autoklavieren: 20 min 121°C

Zugabe von: 5 ml 2,4-D-Lösung (0,2mg/ml)

RNS-Aufnahmepuffer:

0,1 M Tris-HCl, pH 8,0

1% Sarkosyl (Fa. Serva)

Extraktionspuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
4% PAS (Fa. Merck)
1% TNS (Fa. Eastman)

PAS = para-Aminosalicylsäure
TNS = Tri-Isopropylnaphthalensulfonsäure

Bindungspuffer:

0,500 M NaCl
0,010 M Tris-HCl pH 7,6
0,001 M EDTA
0,1% SDS

Elutionspuffer:

0,010 M Tris-HCl, pH 7,6
0,001 M EDTA

Elektrophoresepuffer:

0,090 M Tris HCl, pH 8,0
0,005 M Na_2EDTA
0,090 M Borsäure

2.6.2. Anzucht der Soja-Suspensionskultur

Die Sojabohnen-Zellkultur war ein Geschenk von Dr. E. Jaworski (Monsanto Company, Missouri).

Die Kulturen wurden im Dunkeln bei 27-29°C in 250ml - 300 ml Erlenmeyerkolben, die 100 ml Gamborg B 5 Medium (Gamborg et al. 1968) enthalten, gezogen. Die Belüftung der Suspension wurde durch Schütteln der Kultur (ungefähr 150 Upm) bewirkt. Alle 4-5 Tage wurden die Zellen in frisches Medium überführt.

Bei der Anzucht im größeren Maßstab wurden 2 l-Erlenmeyerkolben mit 900 ml Kulturmedium, verwendet.

2.6.3. Isolierung von poly A^+-RNS aus den Sojazellen

2.6.3.1. Vorbereitung der Lösungen und Materialien

Alle die für die Extraktion der RNS benötigten Glaswaren wurden nach dem laborüblichen normalen Spülvorgang dreimal mit destilliertem H_2O nachgewässert und dann 30 min bei 121°C autoklaviert. Der Extraktionspuffer wurde ebenfalls autoklaviert.

Die Phenollösung wurde jeweils direkt vor der Isolierung frisch hergestellt. 1 kg Phenol wurde mit 1 l 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 etwa 30 min lang geschüttelt. Dies diente zur Sättigung des Phenols mit der wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgegossen und 1 g Hydroxychinolin und 100 ml m-Kresol

zugegeben.

Alle Lösungen und Glasgeräte wurden auf 4°C abgekühlt.

2.6.3.2. Extraktion der Nukleinsäuren

Die Zellen der Suspensionkultur wurden durch Nylongewebe aus dem Medium filtriert und vorsichtig getrocknet. Dann wurde das Frischgewicht der geernteten Zellen bestimmt und 2 ml Extraktionspuffer pro g Zellgewicht zugegeben. Ein gleichgroßes Flüssigkeitsvolumen der Phenollösung wurde zugegeben und mit einem Ultra-Thurrax bei 75% Leistung achtmal 30 sec homogenisiert mit jeweils 15 sec Unterbrechung. Das Homogenat wurde 15 min geschüttelt (bei 4°C!) und dann in einem Sorvall GSA-Rotor bei 12000 g und 4°C 20 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und nochmals mit einem gleichgroßen Volumen Phenol (Tris-HCl gesättigt) : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) 20 min geschüttelt und wiederum zentrifugiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 2,5 Volumen Äthanol (96%) und Natriumacetat (Endkonzentration 0,2 M) bei -20°C über Nacht ausgefällt.

Die Nukleinsäuren wurden bei -20°C in einem Sorvall GSA-Rotor bei 8 000 g abzentrifugiert, getrocknet (bei 4°C) und in wenig RNS-Aufnahmepuffer gelöst.

2.6.3.3. CsCl-Gradienten

Zu den gelösten Nukleinsäuren wurden 1 g CsCl pro g Lösung gegeben und bei 4°C gelöst. Jeweils 2,3 ml dieser Lösung wurden auf 1,2 ml einer 5,7 M CsCl-Lösung (in 100 mM EDTA, pH 7,5)in einem 5 ml Polyallomerröhrchen überschichtet. Das restliche Leervolumen des Röhrchens wurde mit Paraffin gefüllt. Die Röhrchen wurden in einem Beckman SW 50,1 Rotor bei 33 000 Upm 18 h bei 4°C zentrifugiert. Nach Abschluß der Zentrifugation wurde die gesamte Flüssigkeit vorsichtig aus dem Röhrchen mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen. Die Röhrchen wurden getrocknet. Nach dem Sichtbarwerden des Präzipitats wurde die RNS mit dem unterliegenden Anteil des Röhrchenbodens aus dem Röhrchen herausgeschnitten und in RNS-Aufnahmepuffer gelöst. Die RNS-Lösung wurde für 5 Std. gegen RNS-Aufnahmepuffer dialysiert , um restliche CsCl-Anteile zu entfernen und mit 96% Äthanol bei -20°C über Nacht ausgefällt.

2.6.3.4. Oligo dT-Affinitätschromatographie

Die ausgefällte RNS wurde abzentrifugiert, getrocknet in Elutionspuffer gelöst. Die RNS-Lösung wurde für 2 min auf 70°C erhitzt, um die Aggregation der RNS aufzuheben. Die Probe wurde dann sofort auf Eis gestellt und mit einer 5 M NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,5 M NaCl eingestellt. Die RNS-Lösung wurde mit Bindungspuffer auf eine Konzentration von 400 µg RNS/ml eingestellt.

0,2 g Oligo-dT-Cellulose (Colloborative Research Comp.) wurden in Bindungspuffer über Nacht äquilibriert und dann in eine Säule (mit Kühlmantel) gegeben. Die gepackte Säule wurde bei 45°C mit Elutionspuffer durchgespült und dann in Bindungspuffer äquilibriert (25°C).

2 ml der RNS-Lösung wurden auf die Oligo-dT-Celluloseläule aufgetragen und langsam (etwa 0,3 ml/min) durch die Säule laufen gelassen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und abermals aufgetragen. Danach wurde mit 15 ml Bindungspuffer nachgewaschen. Der Säulenauslauf wurde verschlossen und 4 ml Elutionspuffer zugegeben. Die aufgefangenen Durchlaufvolumina wurden vereinigt und die in dieser Lösung enthaltene poly A^--RNS mit 96%igen Äthanol bei -20°C ausgefällt. Die verschlossene Säule wurde währenddessen auf 45°C aufgewärmt. Der Säulenauslauf wurde geöffnet und die nun eluierte poly A^+-RNS direkt in einem Erlenmeyerkolben mit vorgekühltem Äthanol aufgefangen. Die poly-A^+-RNS präzipitierte sofort. Der Vorgang der Präzipitation wurde über Nacht bei -20°C vervollständigt.

2.6.4. Markierung von poly A^+-RNS in vitro mit ^{125}Jod

Die präzipitierten beiden RNS-Fraktionen wurden abzentrifugiert, getrocknet und in dest. H_2O gelöst. Über Nacht wurde gegen dest. H_2O dialysiert und dann die In-vitro-Markierung mit ^{125}J wie unter 2.1.7. beschrieben durchgeführt. Die spezifische Radioaktivität betrug: 7,5 • 10^6CPM/µg (poly A^-) und

$8{,}3 \cdot 10^5$ CPM/µg (poly A^+).

2.6.5. Charakterisierung der Komplexität von poly A^+- und poly A^--RNS

2.6.5.1. Präparative Auftrennung von poly A^+-und poly A^--RNS

Etwa 8 mg poly A^--RNS wurden auf ein 2%iges präparatives Agarosegel aufgetragen (s.2.2.4) und im Tris-Borat-Puffersystem 2 1/2 Tage stoßweise elektrophoretisch aufgetrennt und eluiert.

Mit der poly A^+-RNS wurde analog in einem separaten Experiment verfahren; es wurden etwa 4 mg poly A^+-RNS aufgetragen. Von jeder eluierten Fraktion der beiden Elektrophoresen wurden jeweils 100 µl im Beckman-Szintillationszähler (γ-Kanal) gemessen.

2.6.5.2. Hybridisierung der einzelnen poly A^+- und poly A^--RNS-Fraktionen

Soja-Gesamt-DNS wurde in 2 µg Portionen aufgeteilt und jeweils mit Bam HI oder Eco RI Restriktionsendonuklease abgebaut. Die abgebaute DNS wurde auf 1%ige oder 1,5%iges Agarosegele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulosefilter eluiert (s.2.1.5. udn 2.1.6.) Die verschiedenen Peak-Fraktionen der präparativen Auftrennung von poly A^+-und poly A^--RNS wurden jeweils separat mit

der eluierten restriktionsenzymabgebauten Soja-Gesamt-DNS nach 2.1.8. hybridisiert (Konz. 2 µg/ml).

3. Ergebnisse

3.1. Restriktionskartierung der ribosomalen Gene

Für die Restriktionskartierung der ribosomalen Gene ist es erforderlich, reine rRNS für die Southern-Hybridisierung zu isolieren. Die Reinheit der rRNS ist eine entscheidende Voraussetzung für die Identifizierung der Hybridisierungsbanden. Beim Aufstellen der Restriktionsfragmentkarte werden alle Daten der Hybridisierung zu einem in sich geschlossenen Kartierungsmodell vereinigt. Die bei jedem Restriktionsenzym-Abbau auftretenden unvollständigen Abbaubanden erleichtern die Kartierung der einzelnen Schnittstellen zueinander. Die Fragmentkarte wird durch Kombination der vollständig abgebauten Fragmente mit den unvollständig abgebauten Fragmenten erstellt. Einige vollständige Abbaubanden treten bei keinem Abbau (auch nach längerer Inkubation) auf und werden aus den Daten der unvollständig abgebauten Fragmente indirekt erschlossen.

3.1.1. Isolierung und Jodierung von ribosomaler RNS

Das Absorptionsprofil des linearen Saccharosegradienten zur Auftrennung der Ribosomenuntereinheiten ist in Abbildung 1 zu sehen. Die Auftrennung ist genügend scharf, um die Abtrennung der 40 und 60 S Untereinheiten voneinander und des nicht dissoziierten 80 S Monosoms zu gewährleisten. Abbildung 2 zeigt die Auftrennung der 60 S-Untereinheit isolierten rRNS auf isokinetischen Saccharosegradienten in

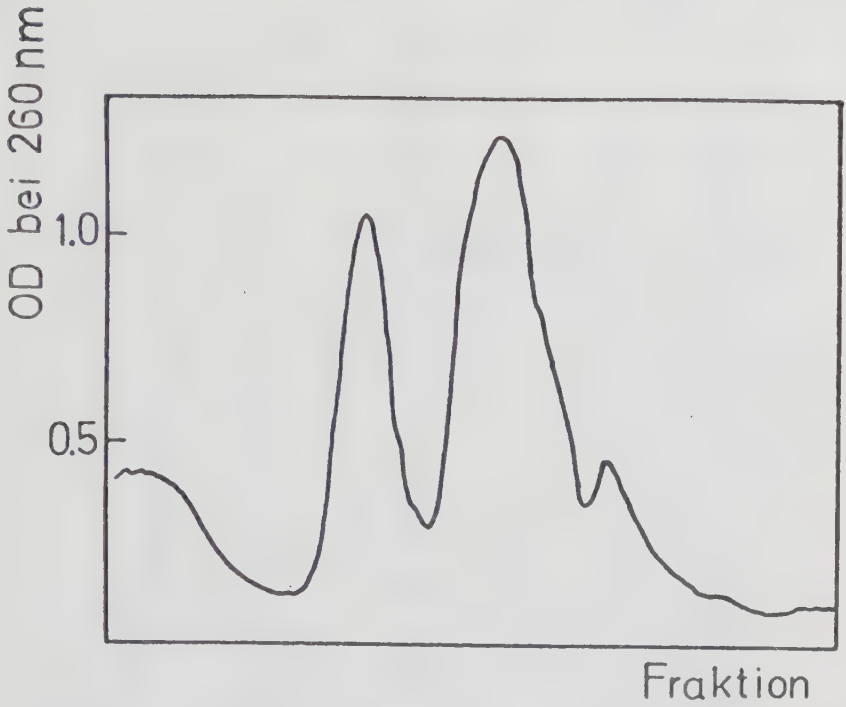


Abbildung 1: Auftrennung von Sojabohnen-Ribosomenunter-einheiten in einem linearen Saccharose-gradienten.

Sojabohnenribosomen wurden nach 2.1.7. isoliert. Das Ribosomenpellet wurde in Gradientenpuffer aufgenommen und auf einen linearen Saccharosegradienten (15-33%) aufgetragen. Die Gradienten wurden in einem Beckman SW 27-Rotor 18h bei 20 000 Upm und 2°C zentrifugiert und anschließend mit einem Isco-Fraktionator mit Flow-Cell (260 nm) vom oberen Ende her abgepumpt.

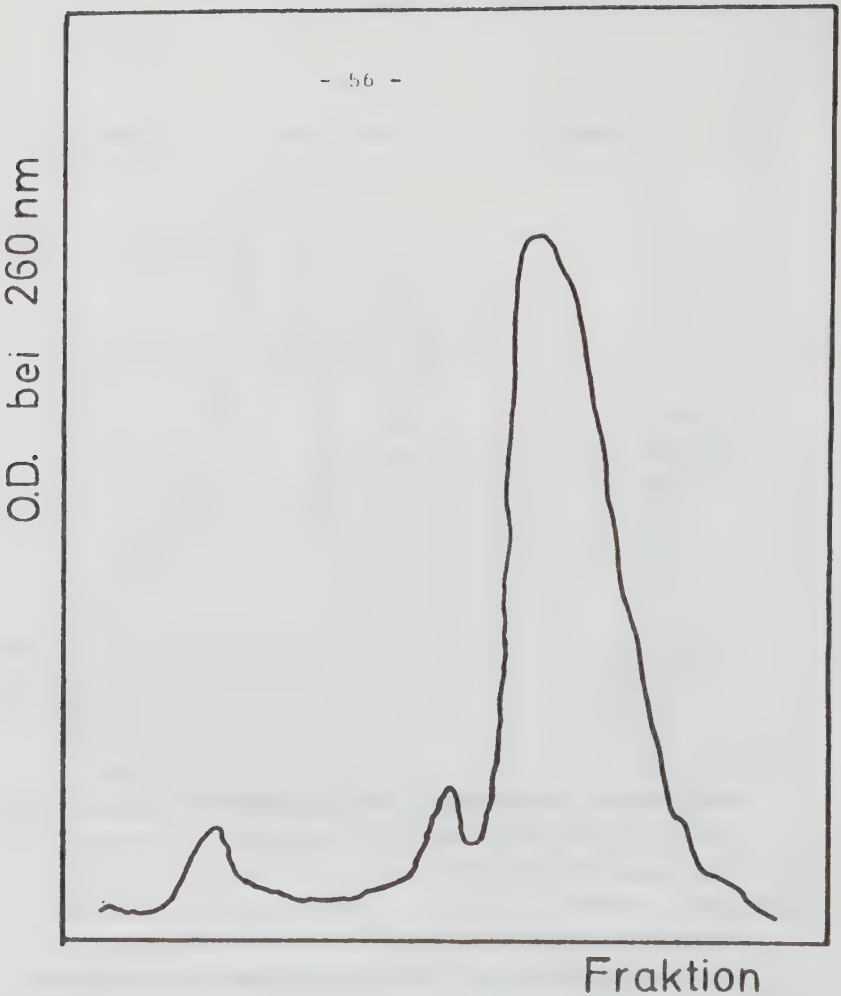


Abbildung 2: Charakterisierung der in der 60 S-Ribosomenuntereinheit enthaltenen rRNS. Die rRNS wurde nach 2.1.7. aus der 60 S-Untereinheitenfraktion isoliert und 1 mg rRNS auf einen exponentiellen Gradienten (0,3 - 1,4 M Saccharose) aufgetragen. Die Gradienten wurden in einem Beckman SW 40-Rotor 18 h bei 36 000 Upm und 4°C zentrifugiert. Es folgte eine Fraktionierung vom oberen Ende des Gradienten her. Die Absorption bei 260 nm wurde kontinuierlich mit einer Flow-Gel gemessen.

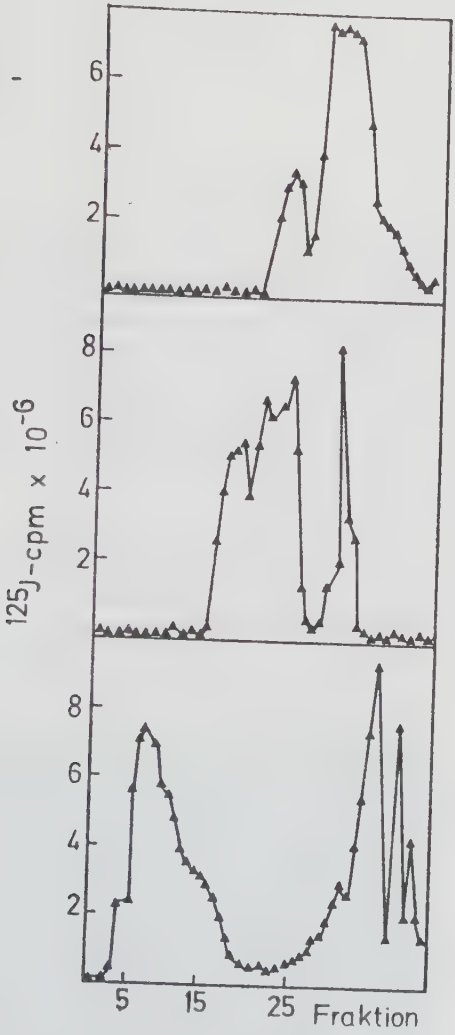


Abbildung 3 : Auftrennung des rRNS-In-vitro-Jodierungs-Ansatzes.

Das ^{125}J-rRNS-Reaktionsgemisch wurde nach Beendigung der Reaktion auf eine Sephadex G-25 (fine)-Säule aufgetragen, mit dest. H_2O eluiert und in 5 Sekunden-Intervallen fraktioniert. Von jeder Fraktion wurden je 5 µl auf ein Glasfiberfilter (Whatman G 2,4) aufgetragen, die Filter getrocknet und die ^{125}J-Radiokativität im Gamma-Counter bestimmt.

5 S und 25 S rRNS. Die aus der 40 S Untereinheit isolierte rRNS (18 s rRNS) wurde keiner zusätzlichen Zentrifugation unterworfen. Alle drei rRNS-Spezies wurden getrennt in vitro mit ^{125}Jod markiert. Die Elutionsprofile des jeweiligen Reaktionsansatzes über G-25-Sephadex-Säule sind in Abbildung 3 a-c dargestellt.

Die hochmolekularen rRNS-Spezies 18 S und 25 S lassen sich sehr gut von den Fraktionen des nicht reagierten Jods abtrennen. Die niedermolekulare 5 S rRNS kommt bei einer Auftrennung über Sephadex G-25 den Fraktionen von nicht reagiertem Jod sehr nahe. Eine für diese rRNS effektivere Trennung sollte deshalb über G-50 bzw G-75 Sepharose erfolgen.

3.1.2. Restriktionsfragmentkartierung der *Brassica pekinensis* 18S und 25S rRNS-Gene

Von *Brassica pekinensis* lagen zwei Sorten zur Untersuchung vor: "Granat" und "Honkong". Beide Sorten ergaben im Restriktionseinzel- und Doppelabbau mit ^{125}J- rRNS (18 S und 25 S) die gleichen Bandenmuster (Abb. 4 und Tab. 1). Allerdings besteht ein Unterschied im Auftreten der unvollständigen Abbaubanden. Honkong DNS wird bei gleicher Inkubationszeit und verwendeter Enzymkonzentration langsamer abgebaut als Granat-DNS. Eine Ausnahme bildet der Hind III-Abbau, der mit der Sorte Honkong keine eindeutige Bande ergibt. Alle übrigen vollständigen Abbaubanden sind jedoch bei Granat und Honkong iden-

a
x 10⁶ Dalton
10
6
4
3
2
1
A BC DE FG HI
A BC DE FG HI
10
6
4
3
2
1

a
x 10⁶ Dalton
10
6
4
3
2
1
A B C D E F G H I
10
6
4
3
2
1
A B C D E F G H I

Abbildung 4: Restriktionsendonuklease-Abbau angereicherter Brassica pekinensis (Chinakohl)- rDNS und anschließende Hybridisierung dieser Fragmente mit ^{125}J-markierter rRNS.

Jeweils 2 µg angereicherter Chinakohl- rDNS wurden bei einem Einzelabbau mit 10 Units Restriktionsendonuklease 2 Std. bei 37°C inkubiert. Bei einem Doppelabbau folgte danach eine Einstellung der Ionenkonzentration auf die des Inkubationspuffers für das zweite Restriktionsenzym; dann wurden 10 Units des zweiten Restriktionsenzym zugegeben und wiederum 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die abgebaute DNS wurde über ein 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter eluiert und mit ^{125}J-18 S und -25 S Sojabohnen- rRNS hybridisiert.

Abb. 4a: Abbau der Brassica pekinensis, Sorte Granat-DNS mit folgenden Restriktionsendonukleasen:

A Bam HI
B Eco RI
C Hind III
D Bam HI/Eco RI-Doppelabbau
E
F Bam HI/Hind III-Doppelabbau
G
H Eco RI/Hind III-Doppelabbau
I

Abb. 4b: Abbau der Brassica pekinensis, Sorte Honkong-DNS mit folgenden Restriktionsendonukleasen:

A Bam HI
B Eco RI
C Hind III
D Bam HI/Eco RI-Doppelabbau
E
F Bam HI/Hind III-Doppelabbau
G
H Eco RI/Hind III-Doppelabbau
J

Tabelle 1 Restriktionsfragmente von Brassica pekinensis-rDNS

Abbau mit Restriktionsenzym	Molekulargewicht (x 10^6 Dalton)	vollständiger Abbau	unvollständiger Abbau	Sorte Granat	Sorte Honkong
Bam HI	1,0	+		+	+
	1,3	+		+	+
	1,7	+		+	+
	2,2	+		+	+
	3,2		+	+	+
	4,1		+	+	+
	5,4		+	+	+
	6,3		+	+	+
Eco RI	1,0	+		+	+
	1,2	+		+	+
	1,6	+		+	+
	2,2	+		+	+
	3,0		+	+	+
	3,2		+	+	+
Hind III	6,2	+		+	-
Bam HI/ Eco RI	0,9 (Doppelabbau)	+		+	+
	1,0 (Bam HI)	+		+	+
	1,1 (Eco RI)	+		+	+
	1,3 (Eco RI)	+		+	+
	1,6 (Eco RI)	+		+	+
	2,0 (Doppelabbau)		+	+	+
	2,3 (Bam bzw. Eco)	+		+	+
	2,9 (Eco RI)		+	+	+
	3,8 (Doppelabbau)		+	+	+
	4,1 (Bam HI)		+	+	+
	4,8 (Doppelabbau)		+	+	+

Abbau mit Restriktionsenzym	Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	vollständiger Abbau	unvollständiger Abbau	Sorte Granat	Sorte Honkong
Bam HI/	0,9 (Bam HI)	+		+	+
Hind III	1,4 (Doppelabbau)		+	+	+
	1,7 (Bam HI)	+		+	+
	2,1 (Bam HI)	+		+	+
	2,6 (Doppelabbau		+	+	+
	3,2 (Bam HI)		+	+	+
	3,7 (Doppelabbau)		+	+	+
	4,1 (Bam HI)		+	+	+
	4,8 (Doppelabbau)		+	+	+
Eco RI/	1,0 (Eco RI)	+		+	+
Hind III	1,2 (Doppelabbau)	+		+	+
	1,5 (Eco RI)	+		+	+
	2,2 (Eco RI)	+		+	+
	2,6 (Eco RI)		+	+	+
	2,9 (Doppelabbau)		+	+	+
	3,3 (Eco RI)		+	+	+
	3,8 (Doppelabbau)		+	+	+
	4,2 (Doppelabbau)		+	+	+

Anmerkung a: In dieser Tabelle sind alle Fragmente aufgeführt, die in ihrer Gesamtheit nur bei einem vollständigen Abbau mit dem jeweiligen Restriktionsenzym auftreten. Einige dieser aufgezählten Fragmente wurden indirekt aus den unvollständigen Banden erschlossen, da ein absolut vollständiger Abbau nicht erzielt werden konnte (s. Abb. 4).

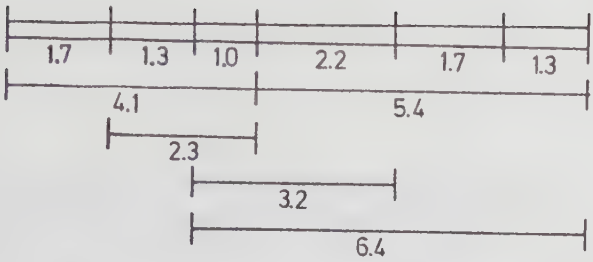
tisch. Die Größe der Repeating-Unit ergibt sich aus dem Vergleich des Hind III-Einzelabbaus mit den addierten Werten der vollständigen Bam HI- und Eco RI-Abbaufragmente. Der Hind III-Abbau ergibt mit Granat-DNS eine einzige Bande von $6,2 \times 10^6$ Dalton; die Summe der vollständig abgebauten Bam HI-Fragmente ergibt $6,2 \times 10^6$ Dalton, die Summe der vollständig abgebauten Eco-RI-Fragmente $6,0 \times 10^6$ Dalton. Die unvollständig abgebauten Bam-HI-Fragmente fügen sich ebenfalls in das Modell einer Repeating-Unit-Größe von $6,1 \times 10^6$ Dalton: Das $3,2 \times 10^6$ Dalton Fragment entsteht durch die Nachbarschaft der Bam HI-Fragmente von 2,2 und $1,0 \times 10^6$ Dalton, die $4,1 \times 10^6$ Dalton Bande entsteht durch die Nachbarschaft der 2,2 und 1,7 und $1,3 \times 10^6$ Dalton Fragmente und die $6,3 \times 10^6$ Dalton Bande beinhaltet alle Bam HI-Einzelfragmente.

Die Kombination dieser Daten führt zur Aufstellung der Bam HI-Karte (Abb. 5a).

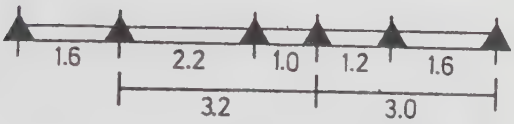
Die unvollständigen Abbaubanden für Eco RI bestätigen ebenfalls die Größe der Repeating-Unit von $6,2 \times 10^6$ Dalton. Die unvollständige Abbaubande von $3,2 \times 10^6$ Dalton setzt sich aus den benachbarten Eco-RI-Fragmenten von 2,2 und $1,0 \times 10^6$ Dalton zusammen, die unvollständige $3,0 \times 10^6$ Dalton-Bande aus den benachbarten Fragmenten von 1,2 und 1,6 $\times 10^6$ Dalton.

Der relative Abstand der Bam HI-Erkennungsregionen zu der Hind III-Schnittstelle ergibt sich aus dem Hind III/Bam HI-Doppelabbau (Tab. 1). Die zu den

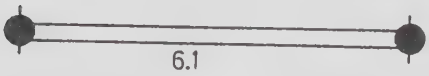
a) Bam HI



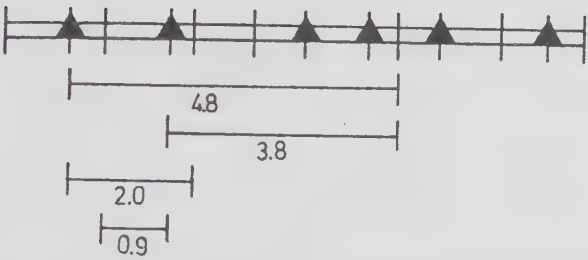
b) Eco RI



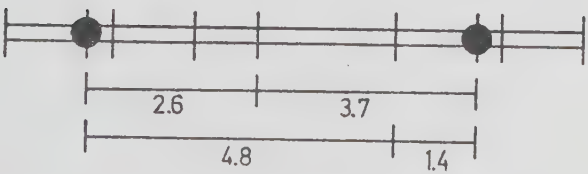
c) Hind III



d) Bam HI / Eco RI



e) Bam HI / Hind III



f) Eco RI / Hind III

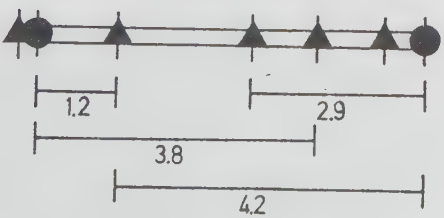
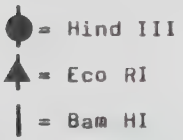


Abbildung 5: Restriktionsfragmentkarte der rDNS-Repeating-Unit von Brassica pekinensis.

Ausgehend von den Daten aus Tab.1 und Abbildung 4 wurde eine Fragmentkarte aufgestellt, die alle diese Ergebnisse in sich vereinigt. Die Zahlenangaben stellen die Molekulargewichte der Fragmente in Millionen Dalton dar (z.B. 1,7 = $1{,}7 \times 10^6$ Dalton).



Einzelabbaubanden zusätzlich auftretenden Banden von 4,8, 3,7, 2,6 und 1,4 x 10^6 Dalton machen es möglich, den Hind III-Schnittpunkt relativ zu den Bam HI-Schnittpunkten zu kartieren: Die Hind III/ Bam HI-Doppelabbaubande von 2,6 x 10^6 Dalton läßt sich durch Verlängerung der unvollständigen Bam HI-Bande von 2,3 x 10^6 Dalton um 0,3 x 10^6 Dalton erklären. Dies bedeutet, daß die Hind III-Schnittstelle um 0,3 x 10^6 von einer Begrenzungsseite des originalen 1,7 x 10^6 Dalton Bam HI-Fragmentes entfernt ist und somit die originale 1,7 x 10^6 Bam HI-Bande in 0,3 und 1,4 x 10^6 Dalton spaltet. Die 1,4 x 10^6 Bande ist ebenfalls eine im Doppelabbau zusätzlich auftretende Bande; sie unterstützt die Abstandsbestimmung. Die 4,8 und 3,7 x 10^6 Fragmente lassen sich ebenfalls durch die Lage der Hind III-Schnittstelle im originalen 1,7 x 10^6 Dalton-Bam HI-Fragment erklären (Abb. 5d): Die 3,7 x 10^6 Dalton-Bande entsteht durch einen Hind III-Schnitt in der ehemaligen unvollständigen Bam HI-Bande von 5,4 x 10^6 Dalton. Die 4,6 x 10^6 Dalton-Bande entsteht durch eine 0,3 x 10^6 Dalton Fragmentverlängerung an das unvollständig abgebaute Bam HI-Fragment von 4,5 x 10^6 Dalton. Dieses 0,3 x 10^6 Dalton Fragment entsteht durch den Hind III-Schnitt in der ehemaligen Bam HI-Bande von 1,7 x 10^6 Dalton.

Der Abstand der Eco RI-Schnittstellen relativ zu den Bam HI- und Hind III-Schnittstellen ergibt sich ebenfalls aus den Doppelabbauergebnissen: Die zusätzlichen Banden von 4,8 udn 2,0 x 10^6 Dalton im Bam HI/Eco RI-Doppelabbau deuten auf eine Eco RI-Schnittstelle im 1,7 x 10^6 Bam HI-Fragment hin, die ihrerseits 0,7 x 10^6 Dalton von der Bam HI-

Schnittstelle zwischen der 1,7 und 1,3 x 10^6 Dalton originalen Bam HI-Fragmente entfernt ist. Die übrigen Eco RI/Bam HI Doppelabbaubanden passen in das oben aufgestellte Eco RI-Modell. Das 0,9 x 10^6 Dalton Fragment stellt ein Doppelabbaufragment dar, das in dem auf das 1,7 x 10^6 Bam HI-Fragment folgende Fragment von 1,3 x 10^6 durch eine zusätzliche Eco RI-Schnittstelle erzeugt wird. Der hier gemessene Abstand stimmt genau mit dem innerhalb der Eco RI-Karte überein. Die vierte zusätzliche Doppelabbaubande von 3,8 x 10^6 Dalton paßt ebenfalls in das aufgestellte Bam HI/Eco RI Fragmentkartierungsmodell (Abb. 5e).

Die Lokalisation der Hind III-Schnittstelle zu den Eco RI-Schnittstellen ergibt sich einerseits indirekt; andererseits eröffnet sich aus dem Eco RI/Hind III-Doppelabbau eine gute Kontrollmöglichkeit über die bisher aufgestellten Modelle. Die erhaltenen Eco RI/Hind III-Doppelabbaubanden von 4,2, 3,8, 2,9, 2,6 und 1,2 x 10^6 Dalton passen exakt in das Modell, das aus den bisher erhaltenen Daten aufgestellt wurde (Abb. 5f): alle diese Doppelabbaubanden bestätigen die relative Kartierung der Eco RI-Schnittstellen zu der Hind III.

Die Coding-Sequenzen für die 18 S und 25 S rRNS innerhalb der kartierten Repeating-Unit wurden durch spezifische Hybridisierung mit der jeweiligen ^{125}J-rRNS und Kompetition mit 40 fachem Überschuß der jeweils unmarkierten korrespondierenden rRNS bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abb. 6. Das 25 S rRNS-Gen ist relativ scharf lokalisiert auf Grund der

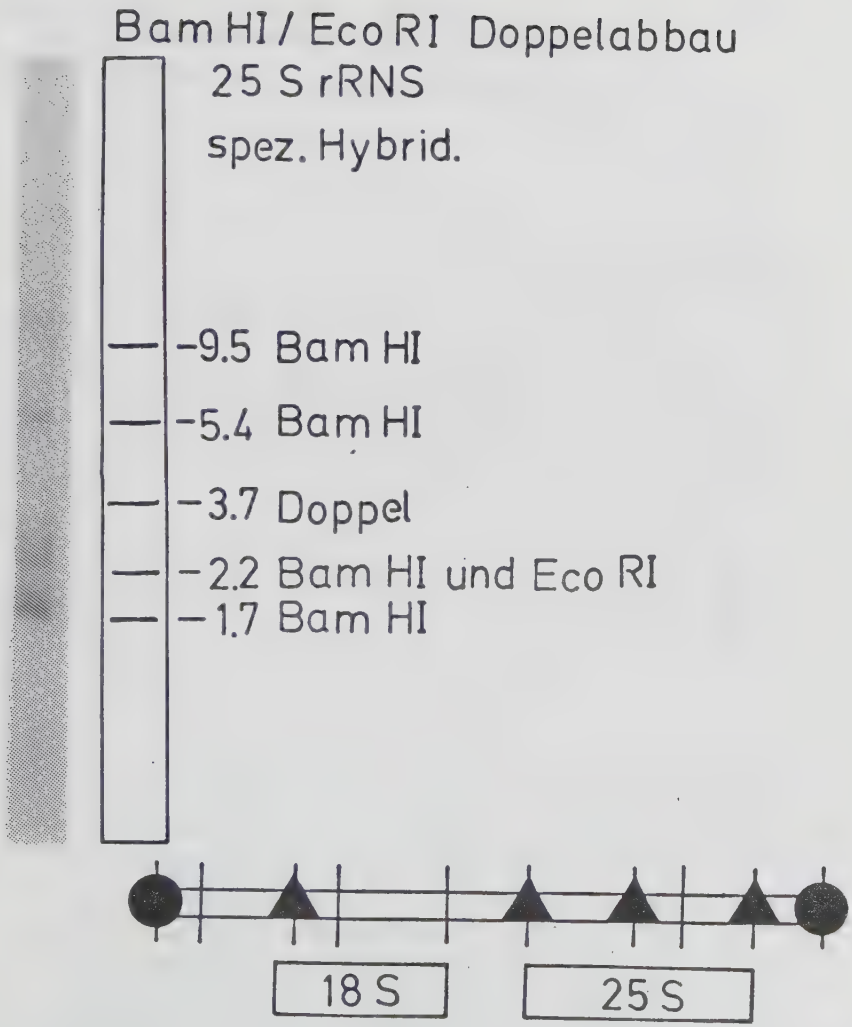

Bam HI / Eco RI Doppelabbau
25 S rRNS
spez. Hybrid.
-9.5 Bam HI
-5.4 Bam HI
-3.7 Doppel
-2.2 Bam HI und Eco RI
-1.7 Bam HI
18 S
25 S

Abbildung 6: Lokalisierung der spezifischen Codierungsregionen für 18 S und 25 S rRNS innerhalb der Brassica pekinensis - rRNS-Repeating-Unit.

Angereicherte rDNS wurde wie unter 2,1,4, beschrieben abgebaut, über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, nach Southern auf Nitrocellulosefilter eluiert und mit reiner ^{125}J-25 S rRNS bei Kompetition mit einer 40-fachen Menge unmarkierter 18 S rRNS hybridisiert. Ein Vergleich der Ergebnisse der spezifischen 25 S rRNS-Hybridisierung mit der 18 S/25 S rRNS-Hybridisierung (vgl. Abb. 4), führte zur Identifizierung der Codierungsregionen innerhalb der Restriktionsfragmentkarte.

= Hind III
= Eco RI
= Bam HI

beiden begrenzenden Eco RI-Schnittstellen. Bei der Lokalisation des 18 S rRNS-Gens liegt eine Unschärfe zwischen der Eco RI-Schnittstelle und der Bam HI-Schnittstelle innerhalb des 1,3 x 10^6 Dalton-Fragments vor.

3.1.3. Restriktionsfragment-Kartierung der Matthiola incana- rDNS

Der Bam HI-Abbau ergibt 4 vollständige und drei unvollständige Banden (Tab. 2). Aufaddiert ergeben die vollständig abgebauten Banden ein Gesamt-Molekulargewicht von 6,1 x 10^6 Dalton. Die Addition der Eco RI-Fragmente des vollständigen Abbaus ergibt einen Wert von 6,0 x 10^6 Dalton. Der Hind III-Abbau ergibt eine einzige Bande vom Molekulargewicht 6,1 x 10^6 Dalton. Aus diesen Daten ergibt sich eine Größe der r DNS-Repeating-Unit bei Matthiola incana von 6,0 - 6,1 x 10^6 Dalton.

Die Kombination der unvollständigen Bam HI-Abbaubanden mit den vollständigen Banden ergibt die Anordnung, die in Abbildung 7a dargestellt ist. Die unvollständige Abbaubande von 2,9 x 10^6 Dalton zeigt die Nachbarschaft der 2,3 und 0,7 x 10^6 Dalton Banden an. Die 3,6 x 10^6 Dalton Bande ergibt, daß zwei 1,5 x 10^6 Dalton Fragmente einander benachbart - bei der Aufeinanderfolge zweier Repeating Units - angeordnet sind. Die 5,9 x 10^6 Dalton Bande (6,1 x 10^6) ergibt die Aneinandereihung der vollständig abgebauten Bam HI-Fragmente. Die Kombination der unvollständigen Eco RI-Fragmenten mit den vollständig abgebauten Frag-

Tabelle 2 Restriktionsfragmente von Matthiola incana- rDNS

Abbau mit dem Restriktionsenzym	Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	bei Doppelabbau: Herkunft	vollständiger Abbau	unvollständige Abbau
Bam HI	0,7	-	+	
	1,5	-	+	
	1,6	-	+	
	2,3	-	+	
	2,9	-		+
	3,6	-		+
	5,9	-		+
Eco RI	1,5	-	+	
	2,0	-	+	
	2,5	-	+	
	3,0	-		+
	3,6	-		+
	3,9	-		+
	4,5	-		+
Hind III	6,1	-	+	
Bam HI/ Eco RI	0,5	Doppelabbau	+	
	0,9	Doppelabbau	+	
	0,7	Bam HI	+	
	1,3	Doppelabbau	+	
	1,5	Bam HI	+	
	1,7	Bam HI	+	
	2,2	Bam HI	+	
	2,6	Doppelabbau		+
	3,3	Doppelabbau		+

Abbau mit dem Restriktionsenzym	Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	bei Doppelabbau: Herkunft	vollständiger Abbau a	unvollständiger Abbau
Bam HI/ Hind III	1,5	Bam HI	+	
	1,6	Bam HI	+	
	2,0	Doppelabbau		+
	2,2	Bam HI	+	
	3,0	Bam HI		+
	3,6	Bam HI		+
	3,5	Doppelabbau		+
Eco RI/ Hind III	0,9	Doppelabbau	+	
	1,2	Doppelabbau	+	
	1,5	Eco RI	+	
	2,0	Eco RI	+	
	2,5	Eco RI	+	

Anmerkung a: Siehe Tabelle 1

menten ergibt analoge Daten zur Erstellung der relativen Kartierung der Eco RI-Fragmente (Abb. 7b). Die 3,9 x 10^6 Dalton Bande belegt die Nachbarschaft des 2,5 x 10^6 Dalton Eco RI-Fragments zum 1,5 x 10^6 Dalton Eco RI-Fragment. Die 3,6 x 10^6 Dalton Bande identifiziert die Nachbarschaft des 2,0 x 10^6 Dalton Eco RI-Fragment zum 1,5 x 10^6 Dalton Eco RI Fragment und die 4,5 x 10^6 Dalton-Bande ergibt die Anordnung dieser zwei übergeordneten Fragmente (3,9 und 3,6 x 10^6 Dalton) zueinander (Abb. 7b).

Die Anordnung der Eco RI-Schnittstellen relativ zu denen des Bam HI-Abbaus läßt sich aus den erhaltenen Fragmenten des Doppelabbaus (Tab. 2) bestimmen. Die zusätzlichen Doppelabbau Banden von 3,3 und 2,6 x 10^6 Dalton ermöglichen die gemeinsame Zuordnung: Die das 2,5 x 10^6 Dalton große Fragment flankierenden 2 Eco RI-Schnittstellen sind in den originalen Bam HI-Fragmenten von 2,3 und 1,5 x 10^6 Dalton lokalisiert. Dabei spaltet die eine Eco RI-Schnittstelle das 2,3 x 10^6 Dalton Bam HI-Fragment in zwei Unterfragmente von 0,9 und 3 x 10^6 Dalton Größe und die andere Eco RI-Schnittstelle das 1,5 x 10^6 Dalton Bam HI-Fragment in zwei Unterfragmente von 1,0 und 0,5 x 10^6 Dalton. Somit läßt sich durch unvollständigen Abbau zwischen den Eco RI und Bam HI-Schnittstellen eine zusätzliche Bande von 3,3 x 10^6 Dalton erzeugen. Die zusätzliche Abbaubande von 2,6 x 10^6 Dalton ist durch einen unvollständigen Abbau zwischen der Eco RI und Bam HI-Schnittstelle der beiden überlappenden originalen 2,0 x 10^6 Dalton Eco RI und 1,5 x 10^6 Dalton originalen Bam HI-Fragmente entstanden. Eine Zusammenfassung dieser Daten ist in Abbildung

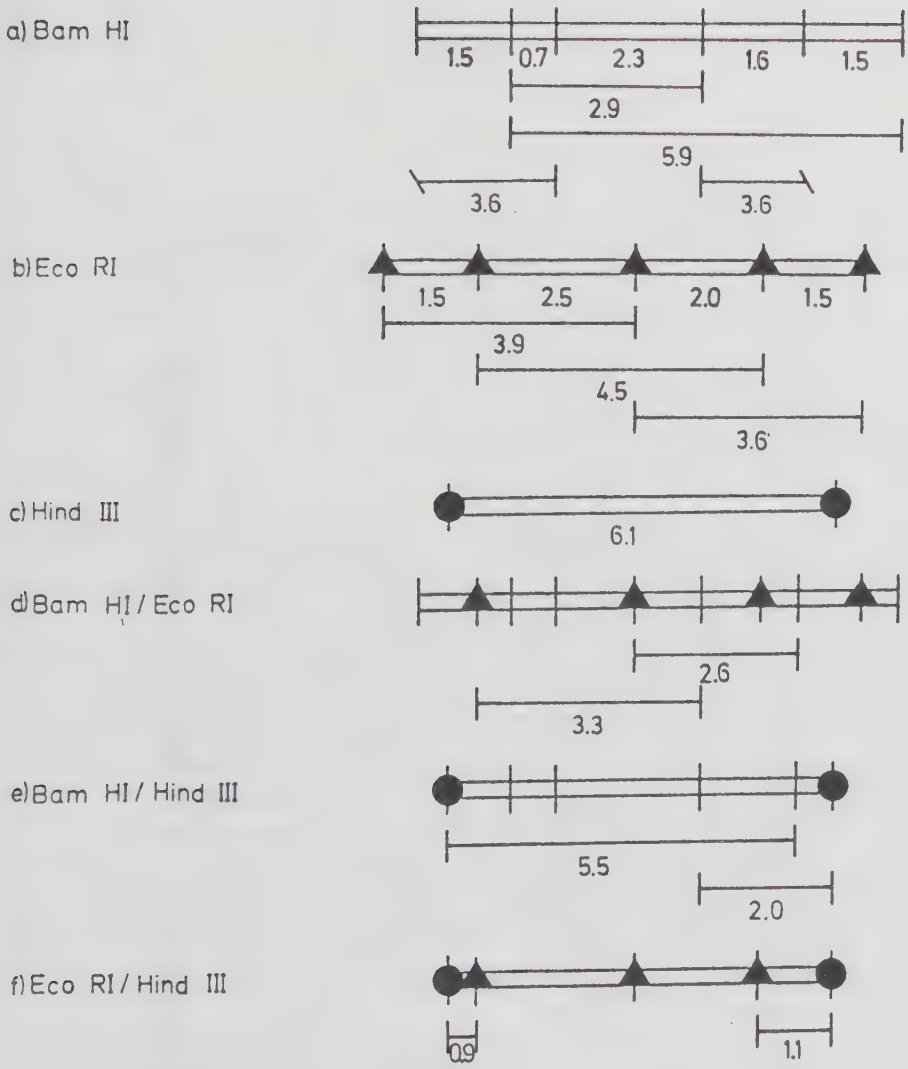


Abbildung 7: Restriktionsfragmentkarte der rDNS-Repeating Unit von Matthiola incana.

Gewinnung der Daten wie für Abb. 4 beschrieben. Die Zahlenangaben stellen die Molekulargewichte der Restriktionsfragmente in Millionen Dalton dar (z.B. 1,5 = $1{,}5 \times 10^6$ Dalton).

● = Hind III

▲ = Eco RI

| = Bam HI

7d dargestellt.

Die Lokalisierung der Hind III-Schnittstelle relativ zur Bam HI Schnittstelle erfolgt auf analoge Weise. Die zusätzlichen Banden des Doppelabbaus (5,5 und 2,0 x 10^6 Dalton) ermöglichen eine einfache Zuordnung (Abb. 7e). Die Hind III Schnittstelle liegt im originalen 1,5 x 10^6 Dalton Bam HI-Fragment und teilt dieses in die beiden Unterfragmente mit der Größe von 0,5 und 1,0 x 10^6 Dalton.

Die Lokalisierung der Eco RI und Hind III-Schnittstellen relativ zu denen von Bam HI findet ihre Bestätigung in den Ergebnissen des Hind III/Eco RI-Doppelabbaus. Die zusätzlichen Doppelabbaubanden von 1,2 und 0,9 x 10^6 Dalton bestätigen die Lokalisierung der Hind III Schnittstelle in dem originalen Bam HI-Fragment von 1,5 x 10^6 Dalton (Abb. 7f). Die Anordnung der Coding-Sequenzen für 18 S und 25 S rRNS innerhalb der Matthiola rDNS-Repeating-Unit ist in Abbildung 8 dargestellt. Für die 18 S rRNS Coding-Region ist es auf Grund der strukturell bedingten Anordnungen der Schnittstellen wiederum etwas schwierig, exakte Begrenzungen anzugeben. Die 25 S rRNS Coding-Region wird von zwei Eco RI Schnittstellen schärfer eingegrenzt.

3.1.4. Restriktionsfragmentkartierung der *Cucumis melo*-rDNS

Der Hind III-Abbau führt zu einer einzigen Hybridi-

spez. Hybridisierung

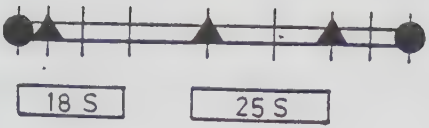


Abbildung 8: Identifizierung der Codierungsregionen für 18 S und 25 S rRNS innerhalb der Matthiola incana - rDNS -Repeating-Unit.

Gewinnung der Daten wie für Abb. 6 beschrieben.

● = Hind III

▲ = Eco RI

| = Bam HI

sierungsbande von 7,7 x 10^6 Dalton. Das ist sehr viel höher als bei den bisher untersuchten Pflanzen-Spezies. Da der Hind III-Abbau nur ein Fragment ergibt, bedeutet dies, daß die Repeating-Unit eine Größe von ungefähr 7,7 x 10^6 Dalton besitzt. Der Bam HI Einzelabbau führt zu 10 Banden, von denen sich je 5 dem vollständigen und unvollständigen Abbau zuordnen lassen (Tab. 3/Abb. 9). Die Summe des vollständigen Abbaus beträgt 7,6 x 10^6 Dalton. Alle zehn Banden lassen sich auf der Basis einer Repeating-Unit von 7,6 - 7,7 x 10^6 Dalton mit folgendem Kartierungsmodell erklären: Die Bam HI Banden von 0,3, 1,1, 1,5, 1,9 und 2,2 x 10^6 Dalton sind die Bestandteile der Repeating-Unit. Mit Hilfe der unvollständigen Abbaubanden lassen sich die obigen Fragmente in eine bestimmte Reihenfolge einordnen: die unvollständige Bande 5,0 x 10^6 Dalton belegt die Nachbarschaft von den 2,2, 0,9 und 1,9 x 10^6 Fragmenten, die 6,3 x 10^6 Dalton Bande bestätigt diese Anordnung und verlängert sie auf einer Seite um das 1,5 x 10^6 Dalton Fragment. Die Banden von 3,9 und 5,9 x 10^6 Dalton ermöglichen es, die Reihenfolge der 2,2, 0,9, 1,5, 1,9 und 1,1 x 10^6 Dalton Fragmente genau festzulegen (Abb. 10a).

Auch der Eco RI-Abbau mit seinen 9 Banden läßt sich auf der Basis einer Repeating-Unit-Größe von 7,6 - 7,7 x 10^6 Dalton erklären. Die Summe der Einzelabbaufragmente liegt etwas höher: 8,2 x 10^6 Dalton. Eine kleine Abweichung von etwa 0,1 x 10^6 Dalton bei den fünf Banden kann einen solchen Wert erklären. Die unvollständigen Abbaubanden von 2,8, 2,9, 4,5 und 5,9 x 10^6 Dalton ermöglichen die Bestimmung der

Tabelle 3 Restriktionsfragmente von Cucumis melo- rDNS

Abbau mit dem Restriktionsenzym	Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	bei Doppelabbau: Herkunft d. Bande	vollständiger Abbau a	unvollständige Abbau
Bam HI	0,9	-	+	
	1,1	-	+	
	1,5	-	+	
	1,9	-	+	
	2,2	-	+	
	3,9	-		+
	5,0	-		+
	5,9	-		+
	6,3	-		+
	7,9	-		+
Eco RI	1,0	-	+	
	1,2	-	+	
	1,6	-	+	
	2,1	-	+	
	2,3	-	+	
	2,8	-		+
	2,9	-		+
	4,5	-		+
	5,9	-		+
Hind III	7,7	-	+	
Hind III/ Eco RI	0,5	Doppelabbau	+	
	1,0	Eco RI	+	
	1,2	Eco RI	+	
	1,6	Eco RI	+	
	1,7	Doppelabbau		+
	2,1	Eco RI	+	

Abbau mit dem Restriktionsenzym	Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	bei Doppelabbau: Herkunft d. Bande	vollständiger Abbau a	unvollständiger Abbau
Hind III/ Eco RI	2,5	Eco RI		+
	2,7	Eco RI		+
	2,9	Eco RI		+
	4,1	Doppelabbau		+
	7,7	Hind III	+	
Bam HI/ Eco RI	0,6	Doppelabbau	+	
	0,8	Doppelabbau	+	
	1,5	Bam HI	+	
	1,7	Doppelabbau		+
	2,5	Doppelabbau		+
	2,8	Bam HI		+
	3,7	Doppelabbau		+
Bam HI/ Hind III	0,7	Doppelabbau	+	
	0,9	Bam HI	+	
	1,1	Doppelabbau	+	
	1,3	Bam HI	+	
	1,7	Doppelabbau		+
	1,9	Bam HI	+	
	2,2	Bam HI	+	
	2,5	Doppelabbau		+
	2,8	Bam HI		+
	3,7	Doppelabbau		+
	4,5	Bam HI		+
	6,3	Bam HI		+

Anmerkung a: Siehe Tabelle 1

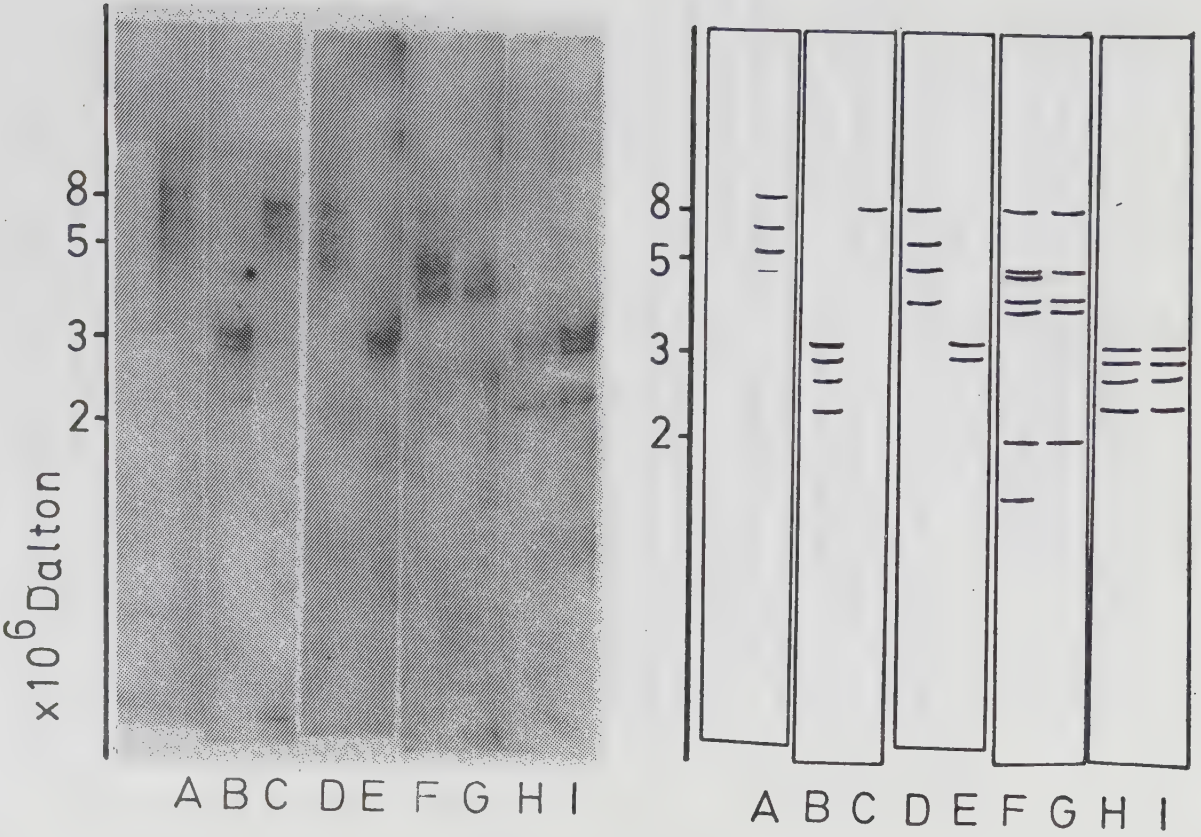

8
5
3
2
x10^6 Dalton
A B C D E F G H I
8
5
3
2
A B C D E F G H I

Abbildung 9: Restriktionsendonuklease-Abbau angereicherter Cucumis melo - rDNS und anschließende Hybridisierung der Fragmente mit ^{125}J-markierter rRNS.

Jeweils 2 µg angereicherte Melonen- rDNS wurden bei einem Einzelabbau mit 10 Units Restriktionsendonuklease 2 Std. bei 37°C inkubiert. Bei einem Doppelabbau folgte danach die Einstellung der Ionenkonzentration auf die des Inkubationspuffers für das zweite Restriktionsenzym. 10 Units des zweiten Restriktionsenzyms wurden zugegeben und wiederum für 2 Std. inkubiert. Die abgebaute rDNS wurde über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter eluiert und mit ^{125}J- 18 S und - 25 S rRNS hybridisiert.

Abbau der Cucumis melo - rDNS mit folgenden Restriktionsenzymen:

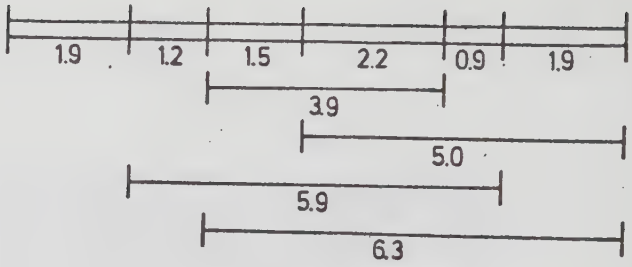
A Bam HI
B Eco RI
C Hind III
D Bam HI/Eco RI
E
F Bam HI/Hind III
G
H Eco RI/Hind III
I

Anordnung der vollständig abgebauten Fragmente von 1,0, 1,2, 1,6 2,1 und 2,3 x 10^6 Dalton (Tab. 3). Die unvollständige Bande von 2,8 x 10^6 Dalton belegt die Nachbarschaft der 1,2 und 1,6 x 10^6 Dalton Eco RI-Fragmente, die unvollständige Bande von 2,9 x 10^6 Dalton belegt die Nachbarschaft der 1,0 und 2,1 x 10^6 Dalton Eco RI-Fragmente und die 4,5 x 10^6 Dalton Bande belegt die Nachbarschaft der 2,1 und 2,3 x 10^6 Dalton Eco RI-Fragmente. Die übergreifende Bande von 5,9 x 10^6 Dalton ermöglicht dann abschließend eine eindeutige Nachbarschaftszuordnung aller Fragmente untereinander (Abb. 10b).

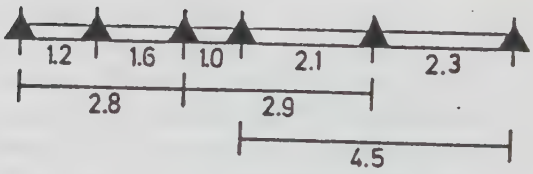
Der Bam HI/Eco RI Doppelabbau ermöglicht eine Bestimmung der Lage der Bam HI-Schnittstellen relativ zu denen von Eco RI, Im Doppelabbau treten fünf zusätzliche Doppelabbaubanden von 3,7, 2,5, 1,7 0,8 und 0,6 x 10^6 Dalton auf, die Eco RI-Schnittstellen in den Original-Bam HI-Fragmenten von 1,2, 1,5 und 2,2 x 10^6 Dalton identifizieren. Die Lokalisation der restlichen Eco RI-Schnittstellen ergibt sich aus der reinen Eco RI-Fragmentkarte (Abb. 10b), die im nun gefundenen Verschiebungsraster über die Bam HI-Fragmentkarte gelegt wird (Abb. 10d).

Die Lokalisierung der einzigen Hind III-Schnittstelle in der Repeating-Unit ergibt sich aus dem Bam HI/Hind III-Doppelabbau. Die fünf zusätzlichen Doppelabbaubanden von 3,7, 2,5 1,7, 1,1 und 0,7 x 10^6 Dalton ergeben übereinstimmend die Zuordnung der Hind III-Schnittstelle in das originale 1,9 x 10^6 Dalton Bam HI-Fragment (Abb. 9e).

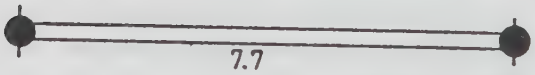
a) Bam HI



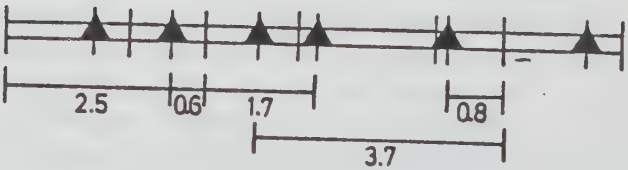
b) Eco RI



c) Hind III



d) Bam HI / Eco RI



e) Bam HI / Hind III

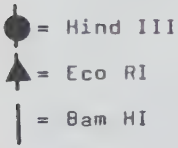
f) Eco RI / Hind III

g) spez. Hybridisierung

Abbildung 10: Restriktionsfragmentkarte der Cucumis melo- rDNS-Repeating-Unit.

Die in der Zeichnung verwendeten Zahlenangaben stellen die Molekulargewichte der Restriktionsfragmente in Millionen Dalton dar (z.B. 1,9 = 1,9 x 10^6 Dalton).

Abb. 10a - f: Physikalische Karte der Restriktionsschnittstellen.
Abb. 10g zeigt die Lokalisierung der 18 S- und 25 S-rRNS-Coding-Regionen innerhalb der Repeating-Unit.



Die zusätzliche Bande des Hind III/Eco RI Doppelabbaus von 4,1 x 10^6 Dalton bestätigt eindeutig dieses Modell (Abb. 9f).

Die spezifische Hybridisierung zur Identifizierung der Coding-Region ergab eine relativ scharfe Abgrenzung im Bam HI/Eco RI Doppelabbau (Abb. 10). Auf Grund dieser Daten kann eine Spacergröße zwischen der 18 S und 25 S rRNS Coding-Region von 1,7 x 10^6 Dalton bestimmt werden.

3.1.5. Restriktionsfragmentkartierung der Phaseolus aureus- rDNS

Die Hybridisierung von angereicherter Phaseolus rDNS mit ^{125}J- rRNS nach Restriktionsenzymabbau und Southern-Eluierung ergab die in Abb. 11 und Tab. 4 dargestellten Banden. Das Restriktionsenzym Bam HI schneidet die Repeating-Unit der Phaseolus rDNS insgesamt viermal und erzeugt die Fragmente von 1,0, 1,2, 1,7 und 2,2 x 10^6 Dalton. Eco RI schneidet ebenfalls viermal pro Repeating-Unit und führt zu folgenden Fragmenten : 0,9, 1,5, 1,7 und 1,9 x 10^6 Dalton. Addiert man diese Fragmente jeweils zusammen, so entsteht eine Gesamtlänge von 6,1 bzw. 6,0 x 10^6 Dalton. Das Restriktionsenzym Hind III erzeugt nur eine Hybridisierungsbande vom Molekulargewicht 6,1 x 10^6 Dalton. Diese Daten zusammengefaßt ergeben ein Modell der Repeating-Unit-Größe von 6,0-6,1 x 10^6 Dalton. Die unvollständigen Ab-

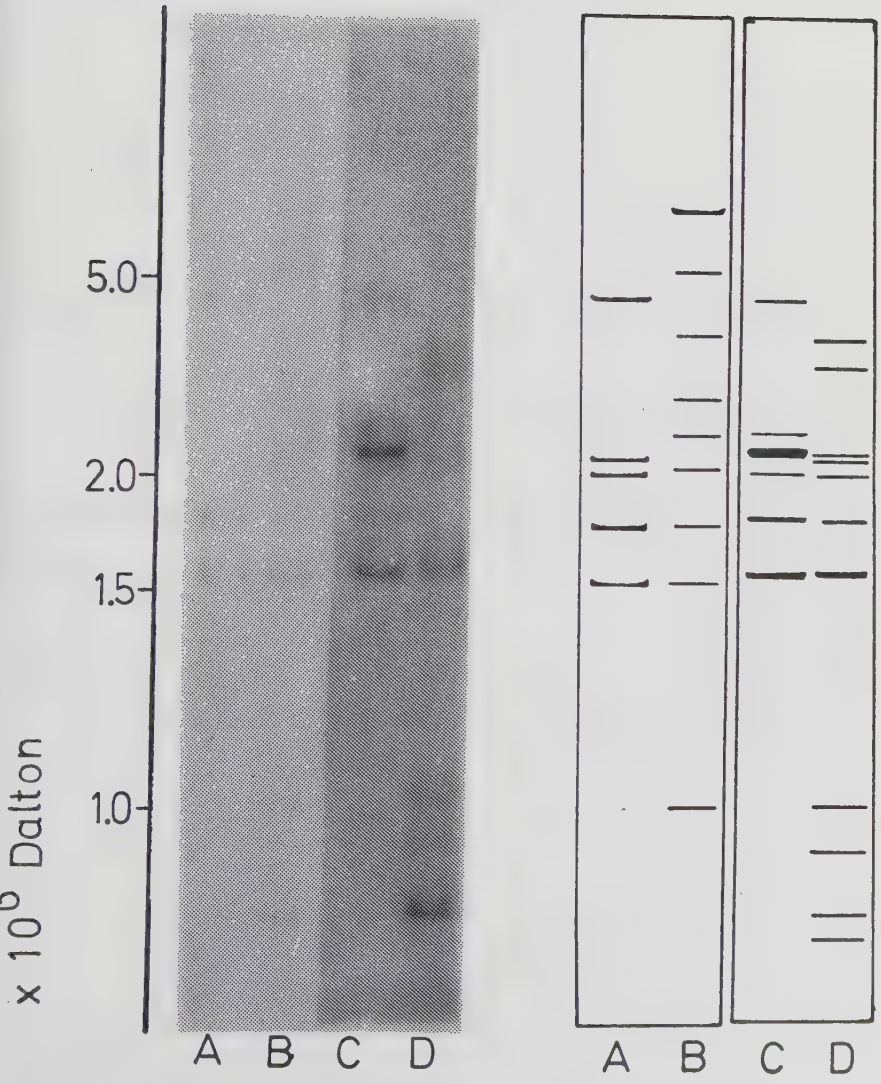

x 10^6 Dalton
5.0
2.0
1.5
1.0
A
B
C
D
A
B
C
D

Abbildung 11: Restriktionsendonuklease-Abbau angereicherter Phaseolus aureus - rDNS und anschließende Hybridisierung der DNS-Fragmente mit ^{125}J-markierter rRNS.

Jeweils 2 µg angereicherte Phaseolus- rDNS wurde bei einem Einzelabbau mit 10 Units Restriktionsendonuklease 2 Std. bei 37°C inkubiert. Bei einem Doppelabbau folgte danach die Einstellung der Ionenkonzentration auf die des Inkubationspuffers für das zweite Restriktionsenzym; 10 Units des zweiten Restriktionsenzyms wurden zugegeben und wiederum für 2 Std. inkubiert.

Die abgebaute rDNS wurde über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter eluiert und mit ^{125}J- 18 S und - 25 S- rRNS hybridisiert.

Abbau der Phaseolus aureus rDNS mit folgenden Restriktionsenzymen:

A Bam HI
B Eco RI
C Bam HI
D Eco RI (Der Abbau in D erfolgte vollständiger als in B.)

Tabelle 4 Restriktionsfragmente von Phaseolus aureus

Abbau mit dem Restriktionsenzym	Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	bei Doppelabbau: Herkunft	vollständiger Abbau a	unvollständiger Abbau
Bam HI	1,0	-	+	
	1,2	-	+	
	1,7	-	+	
	2,2	-	+	
	2,7	-		+
	3,2	-		+
	3,8	-		+
	5,1	-		+
Eco RI	0,9	-	+	
	1,5	-	+	
	1,7	-	+	
	1,9	-	+	
	2,3 b	-		+
	2,5	-		+
	4,5	-		
Hind III	6,1	-		
Bam HI/ Eco RI	0,7	Doppelabbau	+	
	0,8	Doppelabbau	+	
	0,9	Eco RI	+	
	1,0	Bam HI	+	
	1,6	Doppelabbau		+
	1,8	Bam HI		+
	2,1	Bam HI		+
	2,3	Bam HI		+
	3,1	Doppelabbau		+
	3,7	Doppelabbau		+

Abbau mit dem Restriktionsenzym	Molekulargewicht (x 10^6 Dalton)	bei Doppelabbau: Herkunft	vollständiger Abbau a	unvollständiger Abbau
Hind III/ Bam HI	0,5	Doppelabbau	+	
	0,8	Doppelabbau	+	
	1,0	Bam HI	+	
	1,2	Bam HI	+	
	2,2	Bam HI		+
	3,1	Doppelabbau		+
				+

Anmerkung a: siehe Tabelle 1

b: das DNS-Eco RI-Fragment von 2,3 x 10^6 Dalton, das eindeutig eine positive Hybridisierung mit ^{125}J- rRNS zeigt, fügt sich in keiner Weise in eine der aufgestellten Fragmentkarten. Es ist daher in Abb. 12 nicht berücksichtigt worden, ob es sich bei dieser Bande um einen Artefakt handelt, kann nicht ausgeschlossen werden. Die Größe von 2,3 x 10^6 Dalton ist mit keinem Ergebnis des unvollständigen Eco RI-Abbaues in Einklang zu bringen.

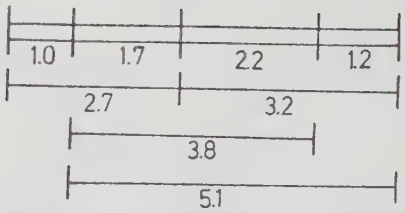
baumuster der beiden Restriktionsenzyme Bam HI und Eco RI bestätigen diese Daten.

Die Bam HI-Bande von $2,7 \times 10^6$ Dalton entsteht durch unvollständigen Abbau der nebeneinanderliegenden Fragmente von 1,0 und $1,7 \times 10^6$ Dalton, die $3,2 \times 10^6$ Dalton Bande besteht aus den Fragmenten von 2,2 und $1,2 \times 10^6$ Dalton. Die Bande von $3,8 \times 10^6$ Dalton ist ein Doppelfragment, das sich aus den Einzelfragmenten 1,7 und $2,2 \times 10^6$ Dalton zusammensetzt und die $5,1 \times 10^6$ Dalton Bande entsteht durch die Nachbarschaft der drei Banden von 1,7, 2,2 und $1,2 \times 10^6$ Dalton (Abb. 12a).

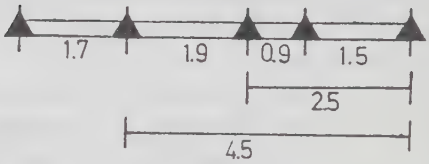
Die unvollständige Eco RI-Abbaubande von $4,5 \times 10^6$ Dalton entsteht durch die Nachbarschaft der drei Fragmente von 1,9, 0,9 und $1,5 \times 10^6$ Dalton, die $2,5 \times 10^6$ Dalton Bande entsteht durch die Nachbarschaft der zwei Fragmente von 0,9 und $1,5 \times 10^6$ Dalton, Die dritte unvollständige Abbaubande von $2,3 \times 10^6$ ist mit den bisher vorliegenden Kartierungsdaten nicht in Einklang zu bringen. Die Bande könnte aus einer Sequenzvariabilität im Eco RI-Schnittbereich herrühren. In Abbildung 12b ist die Auswertung der Fragmentlängen, die zum Aufstellen der Fragmentkarte führt, dargestellt.

Zur Lokalisation der Eco RI-Schnittstellen in den Bam HI-Fragmenten und umgekehrt wurde ein Bam HI/Eco RI-Doppelabbau vorgenommen. Die zu den schon bekannten Einzelabbaubanden von Bam HI bzw. Eco RI zusätzlich auftretenden Doppelabbaubanden ermöglichen eine integrierte Kartierung: die Doppelabbau-

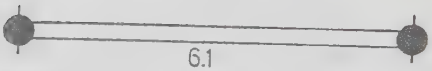
a) Bam HI



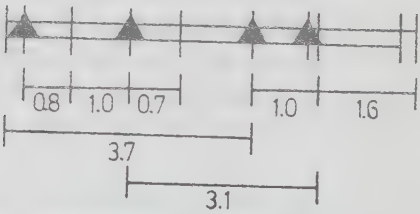
b) Eco RI



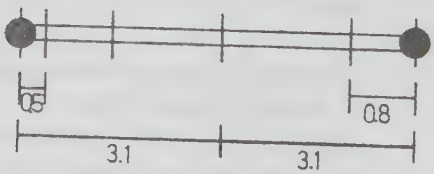
c) Hind III



d) Bam HI / Eco RI



e) Bam HI / Hind III



f) spez. Hybridisierung

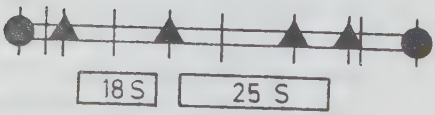
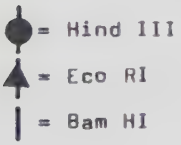


Abbildung 12: Restriktionsfragmentkarte der Phaseolus aureus- rDNS-Repeating-Unit.
Gewinnung der Daten wie für Abb. 11 beschrieben.

Die in der Zeichnung verwendeten Zahlenangaben stellen die Molekulargewichte der Restriktionsfragmente in Millionen Dalton dar (z.B. 1,0 x 10^6 Dalton). Abb. 12f zeigt die Lokalisierung der 18 S und 25 S rRNS-Coding-Regionen innerhalb der Repeating-Unit.



banden von 0,8 und 1,0 x 10^6 Dalton bedingen die Identifikation der von je einer Eco RI-Schnittstelle in den originalen Bam HI-Fragmenten von 1,0 und 1,7 x 10^6 Dalton. Diese Kartierung wird durch die anderen Doppelabbaubanden von 1,0 und 1,6 x 10^6 Dalton bestätigt. Sie ermöglichen die Identifizierung weiterer Eco RI-Schnittstellen im originalen 2,2 x 10^6 Dalton Bam HI-Fragment und zeigen zugleich, daß bei der Kartierung an zwei verschiedenen Stellen, die vorher aufgestellte reine Eco RI-Fragmentkarte sich exakt - aber phasenverschoben - einpaßt (Abb. 12d).

Der Bam HI/Hind III-Abbau ermöglicht die Identifizierung der einzigen Hind III-Schnittstelle in dieser Repeating-Unit (Abb. 12e).

Die Ergebnisse der spezifischen Hybridisierung sind in Abb. 12f dargestellt. Wiederum ist die Lokalisation der 18 S rRNS-Coding-Region auf Grund der umgebenden Restriktionsschnittstellen unschärfer als die für 25 S rRNS Coding-Region.

3.1.6. Nachweis von 5 S rRNS-Coding-Regionen

Brassica pekinensis "Granat" und Matthiola incana angereicherte rDNS wurde über 2 und 3%ige Agarosegele aufgetrennt, nach Southern eluiert und mit ^{125}J-5 S rRNS hybridisiert. Von beiden Pflanzenspezies wurden sowohl im Hind III -, Eco RI- als auch Bam HI-Abbau keine nachweisbaren Hybridisierungsbanden identifiziert. Diese negativen Ergebnisse

werden eingehend in der Diskussion besprochen.

3.2. Klonierung von angereicherter Sojabohnen rDNS

Nach Kartierung und Charakterisierung der rDNS aus verschiedenen höheren Pflanzen bietet sich als nächster experimenteller Ansatz zur weiteren Untersuchung dieser Gene die Methode der Genklonierung an. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, bestimmte eukaryontische DNS-Sequenzen in E.coli zu klonieren: Auf der Seite der zu klonierenden DNS-Sequenz bestehen die Möglichkeiten, entweder Gesamt-DNS eines Organismus zum klonieren zu verwenden oder aber die zu klonierende Sequenz vor der Klonierung aus dem Genom anzureichern. Die eigentliche Klonierung der DNS kann entweder über Restriktionsfragmente und dann T 4-Ligase verknüpfende Reaktionen erfolgen oder aber über die Methoden der Anpolymerisierung von oligo dC- bzw oligo dG-Enden an die lineare Plasmid- bzw. zu klonierende DNS mit anschließender Verknüpfung.

3.2.1. Klonierung des 3,8 x 10^6 Dalton Bst I Fragments

10 µg der Soja-r DNS-Fraktion mit einem Molekulargewicht von 3,8 x 10^6 Dalton wurden mit T_4-Ligase an das Resistenzplasmid pBR 322 ligiert, das seinerseits ebenfalls mit Bst I geschnitten worden war. Der Erfolg der Ligation wurde durch Gelelektrophorese bestätigt (Abb. 14). Der größte Teil der eingesetzten rDNS und der Plasmid-DNS wurden miteinander ligiert.

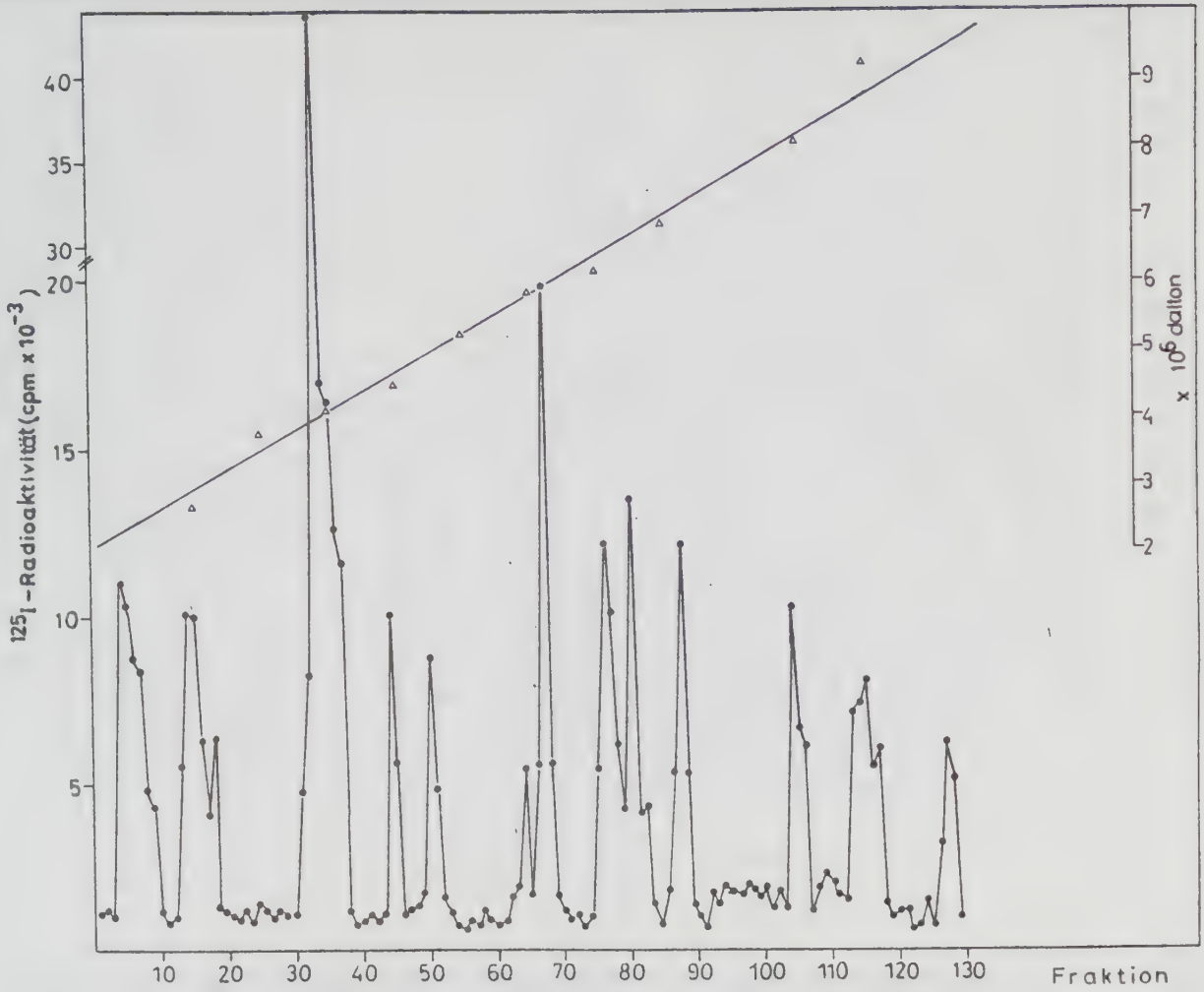

^{125}I-Radioaktivität (cpm x 10^{-3})
x 10^6 dalton
Fraktion
40
35
30
20
15
10
5
9
8
7
6
5
4
3
2
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130

Abbildung 13: Präparative Gelelektrophorese der Bst I-Fragmente der Soja-DNS.

8 mg Gesamt-Sojabohnen-DNS wurden unter unvollständigen Abbaubedingungen mit Bst I-Restriktionsendonuklease gespalten und die abgebaute DNS anschließend phenolextrahiert. Die DNS wurde über ein 1%iges präparatives Agarosegel aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen eluiert (s. 2.2.3.). 100 µl einer jeden Fraktion wurden denaturiert, neutralisiert, die DNS aus diesen Fraktionen auf Nitrocellulosefiltern fixiert und mit ^{125}J-25 S udn 18 S rRNS hybridisiert. Die Radioaktivität jedes Filters wurde im Szintillationszähler gemessen.
Von jeder 10. Fraktion wurden 100 µl entnommen und über ein 1%iges analytisches Agarosegel aufgetrennt zur Ermittlung der Molekulargewichte von den DNS-Fragmenten in den jeweiligen Fraktionen.

● ^{125}J-Radioaktivität

△ Molekulargewicht

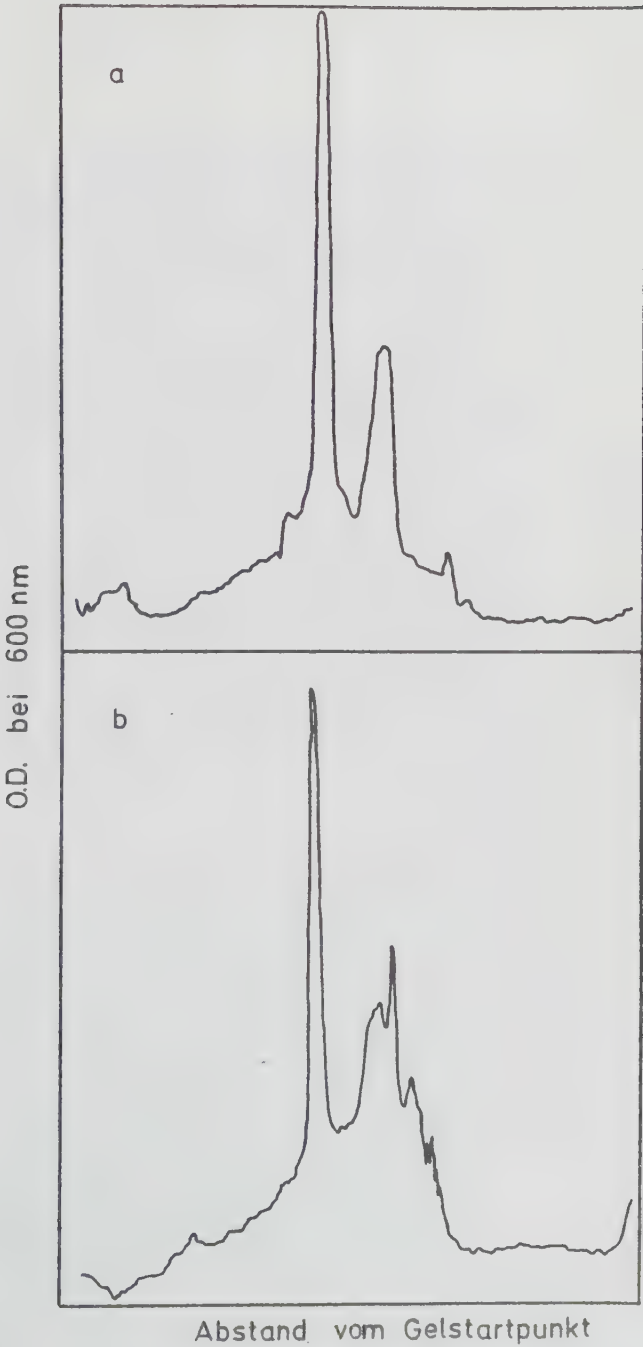

a
b
O.D. bei 600 nm
Abstand vom Gelstartpunkt

Abbildung 14: Ligation der Bst I-abgebauten Soja-DNS an Bst I-abgebaute pBR 322-DNS.

a) Gelscan vor der Ligation:

0,5 µg DNS des Ligationsgemisches wurde vor Zugabe der T_4-Ligase über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Fotografieren des Gels wurde das Polaroidnegativ bei 600 nm in einem Vitatron-Gelscanner densitometrisch vermessen.

b) Gelscan nach der Ligation:

0,5 µg DNS des Ligationsgemisches wurde nach der 16-stündigen Inkubation mit T_4-Ligase über ein 1%iges Agarosegel wie bei a) aufgetrennt. Das Gel wurde fotografiert und das Polaroidnegativ bei 600 nm vermessen.

Nach Screening der Transformanten und Identifizierung der rekombinanten Klone wurde eine Koloniehybridisierung mit ^{125}J-rRNS vorgenommen. Diese Hybridisierung ergab, daß keiner der rekombinanten Klone mit rRNS hybridisiert. Weitere genauere Untersuchungen einzelner Klone nach 1 l-Aufzucht, Plasmidisolierung durch Propidiumjodid CsCl-Gradienten, Restriktionsabbau und Agarosegelauftrennung führten zu dem Ergebnis, daß keiner der untersuchten Klone ein Insert-Fragment von der Größe der eingesetzten DNS ($3,8 \times 10^6$ Dalton) enthält. In Tab. 5 ist das jeweilige Molekulargewicht der geklonten Fragmente aus den untersuchten Klonen zusammengestellt. Die Mehrzahl dieser Klone enthalten Insertionen der Größe zwischen 0,9 und $1,2 \times 10^6$ Dalton. Keines dieser in Tab. 5 aufgeführten Fragmente hybridisiert mit markierter rRNS.

3.2.2. Klonierung angereicherter rDNS mit der Methode des "Tailing"

Nachdem die Klonierung eines präparativ aufgetrennten Restriktionsfragmentes zu einem negativen Ergebnis führte, wurde ein anderer Ansatz versucht. Die rDNS kann durch CsCl-Actinomycin D-Dichtezentrifugation angereichert werden (Hemleben, et al., 1977). Eine durch dieses Verfahren angereicherte Soja-rDNS wurde nach der Methode von Rougern et al.,(1975) mit Hilfe der terminalen Transferase mit oligo dC-Enden in 3'-Richtung versehen (3'Tailing). Eine analoge Einzelstrang-Polymerisationsreaktion wurde mit dem Plasmid pBR 322 vorgenommen: Nach Abbau dieses Plasmids mit dem Restriktionsenzym Bst I, welches glatte Doppelstrangbrüche setzt, wurden oligo-dG-

Tabelle 5 Charakterisierung der Klone

Stamm	Molekulargewicht des DNS-Inserts ($\times 10^6$ Dalton)	Hybridisierung mit ^{125}J-rRNS
pHF 57	0,1	-
pHF 64	1,2	-
pHF 67	1,2	-
pHF 68	1,2	-
pHF 89	1,2	-
pHF 98	1,7	-
pHF 102	0,9	-
pHF 105	0,9	-
pHF 117	0,9	-
pHF 124	1,5	-
pHF 125	1,2	-
pHF 128	0,9	-
pHF 131	0,1	-
pHF 132	1,1	-
pHF 133	1,1	-
pHF 134	0,1	-
pHF 143	1,1	-
pHF 151	0,9	-
pHF 174	0,1	-
pHF 175	1,2	-
pHF 188	1,2	-

Einzelstränge in 3'-Richtung an den Pst-Schnittstellen der Plasmid-DNS angefügt. Das Ausmaß der dann folgenden Annealing-Reaktion wurde über Saccharosegradientenzentrifugation des Reaktionsgemisches vor Beginn und nach Beendigung der Reaktion verfolgt. Dies ist in Abb. 15 dargestellt. Deutlich ist die Erhöhung des Molekulargewichts nach der Annealing-Reaktion zu sehen. E. coli SK 1590 wurde mit dieser Hybrid-DNS transformiert. Das Screening nach rekombinanten Klonen ergab 63 Klone, die alle keine positiven Ergebnisse bei der Koloniehybridisierung mit ^{125}J rRNS aufwiesen. Weitere Tailing-Experimente mit angereicherter rDNS ergaben 167 bzw. etwa 200 Klone, von denen jedoch keiner als rDNS-enthaltender Klon durch Koloniehybridisierung identifiziert werden konnte.

3.2.3. Klonierung von Hind III geschnittener Gesamt-Soja-DNS

Nachdem die Klonierung von angereicherter rDNS nach den unter 3.2.1. und 3.2.2. beschriebenen verschiedenen Klonierungstechniken zu keinem Erfolg geführt hatte, lag die Vermutung nahe, daß die verschiedenen Methoden der Anreicherung auf eine bisher unbekannte Weise die Entstehung und Stabilität von rDNS-Klonen beeinflussen. Es wurde daher eine Klonierung von nichtangereicherter Gesamt-DNS nach der Methode von komplementären Restriktionsschnitten sowohl in der zu klonierenden Gesamt-DNS als auch in dem Klonierungsvehikel mit anschließender T4-Ligase-Reaktion versucht.

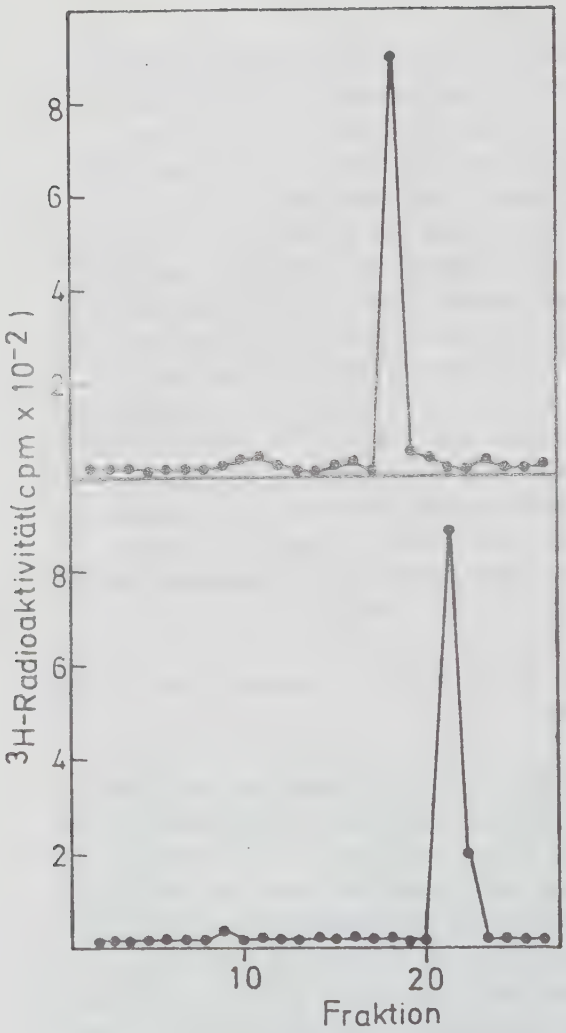


Abbildung 15: Annealing-Reaktion der oligo-G-getailten pBR 322-DNS mit der oligo C-getailten Soja- rDNS.

Die nach 2.3.3./2.3.5. getailten DNS-Spezies wurden nach 2.3.6. in den Annealingpuffer zusammenpipettiert. Gleich nach Fertigstellung des Annealinggemisches wurde ein Aliquot von 10 µl entnommen und auf einen Saccharosegradienten aufgetragen (a). Nach der Annealing-Reaktion wurde wiederum ein gleichgroßes Aliquot von 10 µl entnommen und auf einen analogen Saccharosegradienten aufgetragen (b). Die Gradienten wurden für 3 h bei 50 000 Upm und 4°C mit dem Rotor SW 65 T zentrifugiert. Anschließend wurden von jeder Fraktion 100 µl auf Whatman DE 52-Filter pipettiert, wie in 2.3.7. beschrieben nachgehandelt und im Szintillationszähler gemessen.

Die Restriktionsendonuklease Hind III wurde zum Schneiden der Soja-Gesamt-DNS verwendet, da dieses Enzym nur eine Schnittstelle innerhalb der r RNS-Repeating-Unit besitzt (Friedrich et al., 1979).

In E.coli SK 1590 wurde ein Ansatz von 7,0µg Soja DNS und 1,0 µg pBR 322-Plasmid-DNS, beide mit Hind III-Restriktionsendonuklease abgebaut und die pBR 322-DNS anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt, nach dem Ligaseschritt transformiert. Durch die Methode des Abbaues der freien Phosphatgruppen an die "sticky ends" des restriktionsgeschnittenen Plasmids mit alkalischer Phosphatase gelang es, die Ligasereaktion zwischen Plasmid DNS und der zu klonierenden DNS zu optimieren. Die Reaktion der "Selbstverknüpfung" des Plasmids wird durch den Abbau der Phosphat-Gruppen verhindert.

Das Screening der Transformanten ergibt eine Ausbeute von 93% rekombinanten Klonen. Insgesamt wurden etwa 4 000 verschiedene rekombinante Klone erhalten. In Tabelle 6 sind die Screening-Daten für 700 Transformanten zusammengefaßt.

3.2.3.1. Charakterisierung der Klone pFKM 97 und pFKM 206

Die Koloniehybridisierung der ersten 480 rekombinanten Klone ergab zwei positive Signale für die Klone pFKM 97 und pFKM 206. Ein Fast-Screen ergab deutlich Hybridisierungsbanden. Daraufhin wurden beide Klone in 1 l-Kulturen angezogen, die Plasmid-DNS über CsCl-Propidiumjodid-Gradienten isoliert, mit Restriktionsenzymen abgebaut, über Agarosegele aufgetrennt, nach

Tabelle 6: Screening der Transformanten

Petrischale	Transformanten	Rekombinanten
1	50	48
2	50	47
3	50	45
4	50	49
5	50	43
6	50	48
7	50	48
8	50	47
9	50	48
10	50	45
11	50	49
12	50	43
13	50	46
14	50	45
	700	651

Anteil der Rekombinanten: 93%

Southern eluiert, und dann mit ^{125}J rRNS hybridisiert. Abbildung 18 zeigt das Photo des Agarosegels nach Äthidiumbromidfärbung und darunter den Röntgenfilmstreifen mit den dazugehöringen Hybridisierungsbanden.

Aus den Hybridisierungsdaten ist zu erkennen, daß es sich bei diesen beiden Klonen um ribosomale Klone handelt. Die Größe der rDNS-Insertion beträgt 1,3 x 10^6 Dalton. Dies Abbaumuster mit den verschiedenen Restriktionsenzymen ergibt folgende Daten (Abb. 16): in dem geklonten rDNS-Fragment von pFKM 97 und pFKM 206 ist keine Bam HI - bzw Bst I-Erkennungsregion vorhanden. Das Restriktionsenzym Eco RI (Abb. 16, Segment b) besitzt zwei Schnittstellen innerhalb der klonierten rDNS-Sequenz von 1,4 x 10^6 Dalton, da es ein Fragment von 1,2 x 10^6 Dalton herausschneidet. Auf Grund des nur geringfügig kleineren Molekulargewichts müssen diese beiden Eco RI-Schnittstellen den jeweiligen Hind III-Schnittstellen dicht benachbart sein. Der Hind III Abbau (Abb. 16, Segment c) führt zu zwei Banden mit den Molekulargewichten von 1,4 und 1,2 x 10^6 Dalton; letztere ist schwächer ausgeprägt. Dies deutet wiederum auf eine enge Nachbarschaft zwischen den Eco RI- und Hind III-Schnittstellen hin. Der Doppelabbau Hind III/Eco RI (Abb. 16, Segment d) ergibt jeweils für pFKM 97 und pFKM 206 eine einzige Bande von 1,2 x 10^6 Dalton. Die Zusammenfassung dieser Daten führt zur Aufstellung einer Restriktionskarte für die Plasmide pFKM 97 und 206 (Abb. 17). Ein genauer Vergleich der Restriktionsfragmente der DNS von pFKM 97 und 206 ergibt, daß es sich um identische Klone handelt.

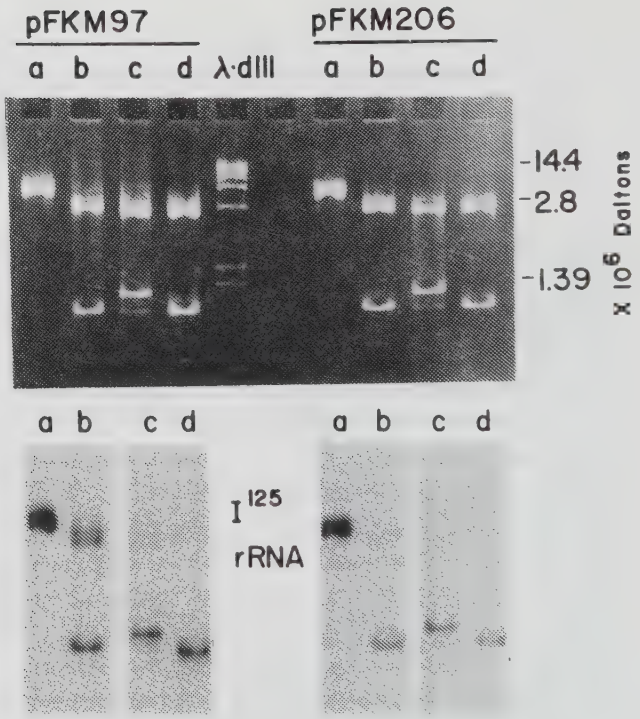


Abbildung 16: Charakterisierung der rekombinanten Plasmide pFKM 97 und pFKM 206.

Jeweils 1 ug pFKM 97-und pFKM 206-DNS wurden mit

a) Bam HI-
b) Eco RI-
c) Hind III-
d) Eco RI/Hind III-Restriktionsendonukleasen abgebaut, über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, gefärbt, fotografiert, nach Southern eluiert und mit ^{125}J- rRNS hybridisiert. Teil A der Abbildung zeigt das Agarosegel nach Anfärbung der DNS-Banden mit Aethidiumbromid; Teil B der Abbildung zeigt das zugehörige Hybridisierungsprofil der Gelstreifen.

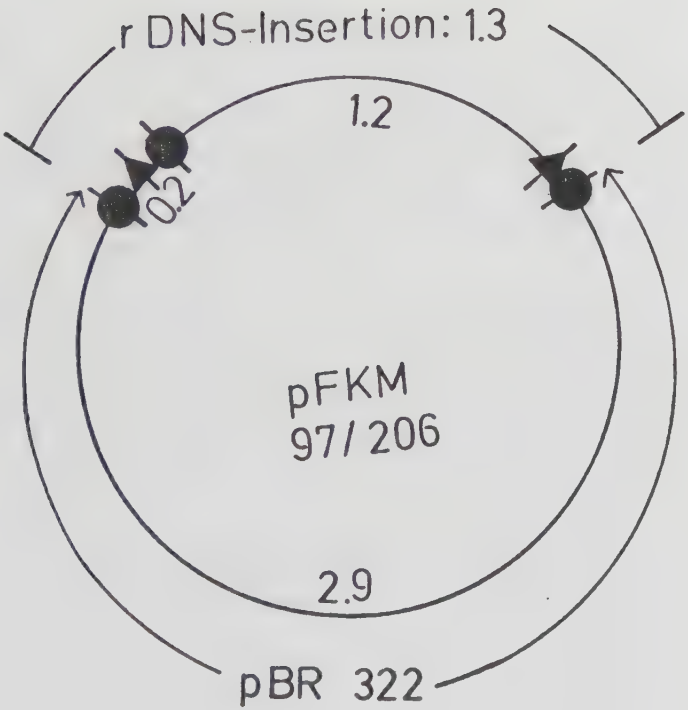


Abbildung 17: Restriktionsfragmentkarte der rekombinanten Plasmide pFKM 97 und 206

Die aus den Daten von Abb. 16 gewonnene Fragmentkarte ist hier dargestellt. Die in der Abbildung verwendeten Zahlenangaben stellen das Molekulargewicht des jeweiligen DNS-Fragmentes in Millionen Dalton dar (z.B. 0,2 = 0,2 x 10^6 Dalton).

● = Hind III

▲ = Eco RI

Mit den Restriktionsenzymen Bst E II, Xba, Pvu wurden ebenfalls Kartierungsexperimente vorgenommen. Die Plasmide pFKM 97 und 206 enthalten keine Schnittstellen für diese Enzyme.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse des Restriktionsabbaus der reinen pFKM 206-Insertion mit den 4 Basen-Restriktionsenzymen Alu I, Cfo, Dde und Eco R zusammengestellt. Eine Feinkartierung der Insertion ist aus methodischen Gründen nicht möglich, da die unterschiedlichen Molekulargewichte eines 6 Basen-4 Basen-Restriktionsenzym-Doppelabbaus im Vergleich zum 4-Basen-Restriktionseinzelabbau nicht zu erhalten sind: die Erkennungsregionen von Hind III liegen an den Enden des Inserts, ebenfalls die von Eco R I. Zusätzliche Erkennungsregionen für 6-Basen-Restriktionsenzyme (wie z.B. Bst E II etc.) könnten bisher nicht identifiziert werden. In Abbildung 18 sind die Möglichkeiten der Fragmentanordnung für die 4-Basen-Restriktionsenzyme dargestellt. Sie sind als ein Modell anzusehen, daß einer Verifizierung durch weitere Daten bedarf.

3.2.3.2. Charakterisierung der Klone pFKM 481-960

Weitere 480 Klone (pFKM 481-960) wurden der Koloniehybridisierung unterworfen und für längere Zeit als die Klone 1-480 auf dem Röntgenfilm exponiert. Auch die schwächer geschwärzten Kolonien wurden charakterisiert. Bei den ersten 480 Klonen (pFKM 1-480) waren nur die intensiven Schwärzungen (pFKM 97 und 206) berücksichtigt worden. In Tabelle 8 sind die Daten zusammengefaßt: In der ersten Spalte der Tabelle sind

Tabelle 7 Restriktionsfragmente von pFKM 206

Abbau mit dem Restriktionsenzym	Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)
Bam HI	4,2
Eco RI	1,1
	2,7
	2,9
Hind III	1,1
	1,3
	2,9
Eco RI/Hind III	1,1
	2,7
	2,9

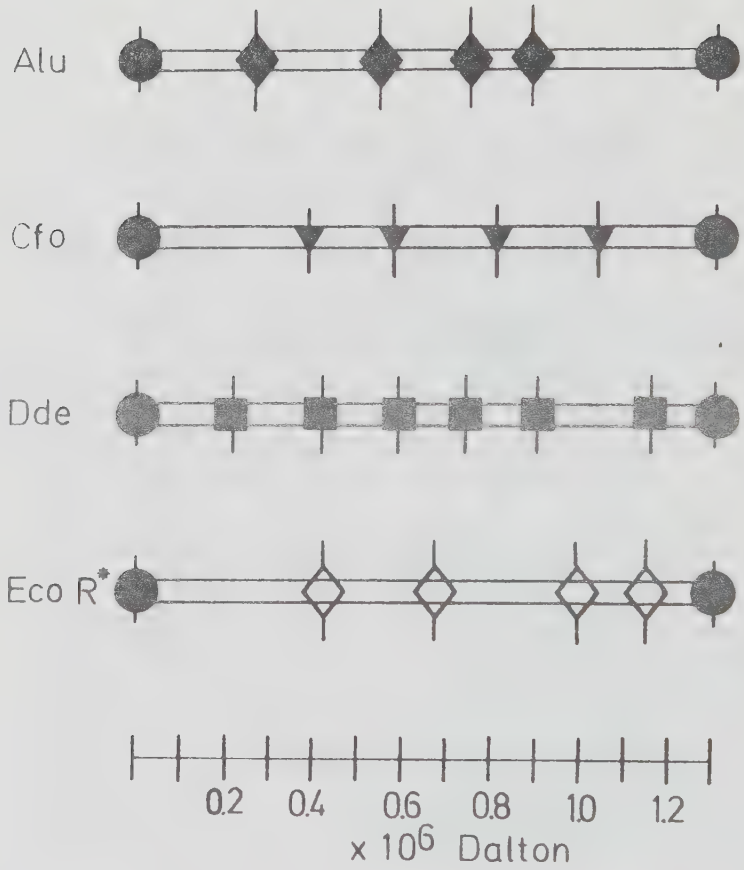


Abbildung 18: Restriktionsfragmentkarte der rDNS-Insertion von pFKM 206 mit 4 Basen Restriktionsendonukleasen.

Die Insert-DNS von pFKM 206 wurde nach 2.5.4. isoliert. Jeweils 1 ug Insert-DNS wurden mit Alu I-, Cfo-, Dde- und Eco RI-Restriktionsendonuklease abgebaut. Die Ergebnisse sind hier in Form einer Fragmentkarte dargestellt.

Tabelle 8 Charakterisierung der durch Koloniehybridisierung als rDNS spezifisch identifizierten Klone

Klon-Nr.	Restriktionsfragmente stimmen mit der genomischen Genkarte überein	Fast-Screen ergibt positive Hybridisierung mit ^{125}J-rRNS	Southernblot-hybridisierung mit ^{125}J-rRNS
493	-	++	++
578	-	+	-
589	-	-	-
645	-	-	-
657	+	-	-
659	+	+	-
668	+	-	-
698	-	-	-
714	-	++	++
798	-	-	-
799	-	-	-
800	-	-	-
810	-	+	-
910	-	+	-
927	-	-	-
938	-	-	-

alle die Klone zusammengestellt, die eine positive Schwärzung bei der Koloniehybridisierung nach längerer Exposition ergaben. Die zweite Spalte der Tabelle gibt an, ob die Restriktionsfragmente der einzelnen Plasmide (nach 1l-Anzucht, CsCl-Propidiumjodid-Reinigung etc.) auf einen Soja-rDNS-Klon hinweisen. Die dritte Spalte der Tabelle zeigt die Hybridisierungsergebnisse.

Die Klone pFKM 657, 659, 668 ließen auf Grund ihrer Bam HI- und Eco RI-Fragmente den Schluß zu, daß es sich um rDNS-Klone handelt. Besonders pFKM 659 ergab im Bam HI-Abbau Banden, die mit aus genomischer DNS bestimmten rDNS-Banden der Sojabohnen übereinstimmten (Friedrich et al., 1979). Die Hybridisierung mit ^{125}J-rRNS verlief jedoch negativ. Die Daten des Hind III-, Eco RI-, und Bam HI-Restriktionseinzelabbaus sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Die aus diesen Daten resultierende Fragmentkarte ist in Abb. 19 dargestellt: Die klonierte DNS-Sequenz ist in der Größenordnung der Soja-rRNS-Repeating-Unit von $5{,}9 \times 10^6$ Dalton. Auch die Eco RI- und Bam HI-Fragmente liegen in der Größenordnung, die für die Soja rDNS bestimmt worden war (Friedrich et al., 1979).

Zwei Klone (pFKM 493 udn 714) hybridisieren mit ^{125}J-rRNS. Diese Klone sind identisch. Die Restriktionsenzymfragmente und die Hybridisierungsbanden sind für beide Klone gleich. Beide Klone enthalten eine rDNS-Insertion von $0{,}8 \times 10^6$ Dalton. Die Abbaudaten dieser Klone mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Eco RI und Hind III sind in Tabelle 10 zusammenge-

Tabelle 9: Restriktionsabbaufragmente von pFKM 659

Abbau mit dem Restriktionsenzym	Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)
Bam HI	0,8
	2,2
	2,7
	2,9
	5,7
Eco RI	0,7
	2,5
	4,7
Hind III	0,8
	2,3
	2,9
	3,5
Hind III/Eco RI	0,8
	2,7
	3,2
Hind III/Bam HI	0,8
	2,5
	2,9
	3,2
	4,0

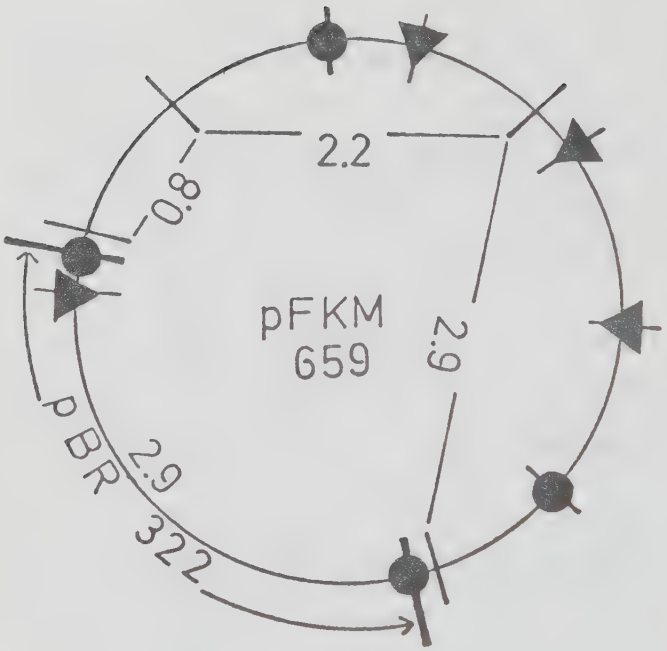


Abbildung 19: Restriktionsfragmentkarte des rekombinanten Plasmids pFKM 659.

Die in der Abbildung vorhandenen Zahlenangaben stellen die Molekulargewichte der einzelnen DNS-Fragmente in Millionen Dalton dar (z.B. 0,8 = 0,8 x 10^6 Dalton).

= Hind III

= Eco RI

= Bam HI

Tabelle 10 Restriktionsabbaufragmente von pfKM 493 und 714

Abbau mit Restriktionsenzym	Banden anfärbbar Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	Banden, die mit ^{125}J-rRNS hybridisieren Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)
Bam HI	3,8	3,8
Eco RI	3,1 0,4-0,5	3,1 0,4-0,5
Hind III	3,7 2,9 0,8	3,7 - 0,8
Bam HI/Eco RI	2,5 2,3 1,7 0,8 0,5 0,4	
Bam HI/Hind III	3,6 3,4 2,9 2,6 1,0 0,8	
Eco RI/Hind III	3,1 2,8 0,4	

faßt. Die daraus resultierende Fragmentkarte ist in Abbildung 20 dargestellt. Die rDNS Insertion wird auf beiden Seiten von je einer Hind III-Schnittstelle gegen das Plasmid pBR 322 abgegrenzt. In diesem 0,8 x 10^6 Dalton-Fragment ist eine Eco RI-Schnittstelle lokalisiert, die diese originale Hind III-Bande in die 0,45 und 0,35 x 10^6 Dalton großen Fragmente aufgespaltet. Die aus dem Doppelabbau resultierenden Fragmente ermöglichen eine eindeutige Einordnung der Insertion innerhalb des Gesamtplasmids (Abb. 20).

3.2.3.3. Charakterisierung der Klone mit Histongen-cDNS

Die Klone 1-480 und 481-960 wurden mit Hilfe der Koloniehybridisierung auf ebentuell enthaltene Histongenfragmente getestet. Als Hybridisierungsprobe wurde ^{32}P-nicktranslatierte DNS (Rigby et al., 1977) von Seeigel-Histongenklonen (Birnstiel et al., 1979) benutzt. Keiner der 960 Klone ergab eine positive Hybridisierungsreaktion. Nicht die Spur einer schwachen Hybridisierung ist erkennbar. Da die Sojabohne 1,625 pg DNS pro haploidem Genom besitzt und die Histongene nicht in einem so hohen Repetitionsgrad wie die rRNS-Gene pro Gesamtgenom vorliegen, ist die Wahrscheinlichkeit auch sehr gering, daß unter nur insgesamt 960 Klonen (pro Soja-Gesamtgenom) ein Klon ist, der eine Histon-Gensequenz enthält.

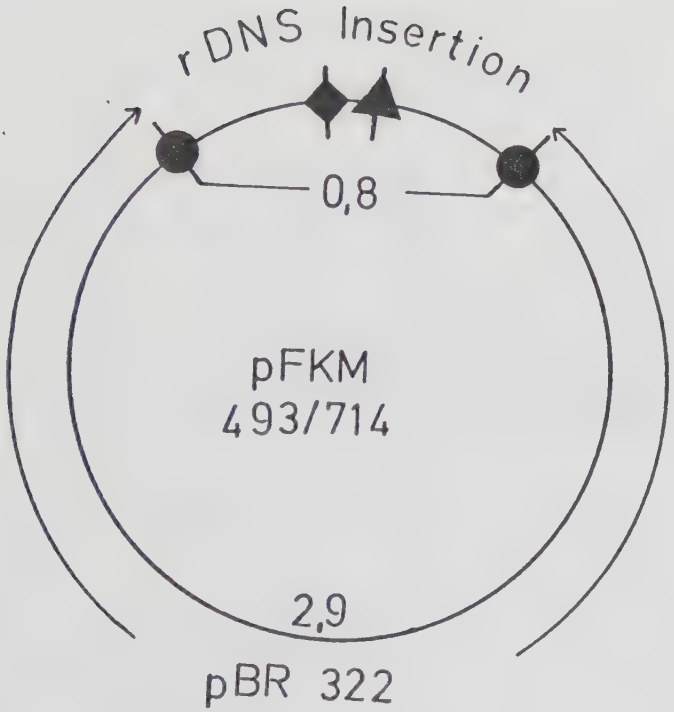


Abbildung 20: Restriktionsfragmentkarte der rekombinanten Plasmide pFKM 493/714.

= Hind III

= Eco RI

= Alu I

3.3 Interaktion zwischen RNS-Polymerase I und klonierter rDNS

Nach der Klonierung eines Teils der Soja- rRNS-Repeating-Unit soll nun untersucht werden, ob innerhalb des geklonten rDNS-Fragmentes Sequenzen enthalten sind, mit denen die RNS-Polymerase I in spezifische Wechselwirkungen tritt. Die folgenden Experimente dienen der näheren Charakterisierung von Bindungswechselwirkungen zwischen der Soja RNS-Polymerase I und dem geklonten rDNS-Fragment.

3.3.1. Bestimmung der optimalen Bindungsbedingungen der RNS-Polymerase I

Die Isolierung der RNS-Polymerase I aus Sojabohnen ist in Abbildung 21 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß eine Anreicherung von der ersten Säule, der Agarosesäule, bis zur letzten Säule, der Phosphocellulosesäule, erfolgt. Allerdings zeigt das Polyacrylamidgel der aktiven Fraktionen der Phosphocellulosesäule noch einige zusätzliche Kontaminationen. Das Enzym ist also nach dem hier eingeschlagenen Reinigungsweg nicht homogen rein dargestellt.

Zur genaueren Charakterisierung wurden verschiedene Messungen der Enzymaktivität abhängig von variierten Salz- und Ionenkonzentrationen vorgenommen. In Abbildung 22a ist die Abhängigkeit der RNS-Polymerase I von der Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Konzentration dargestellt. Das Mg^{2+}-Optimum bei einer Konzentration zwischen

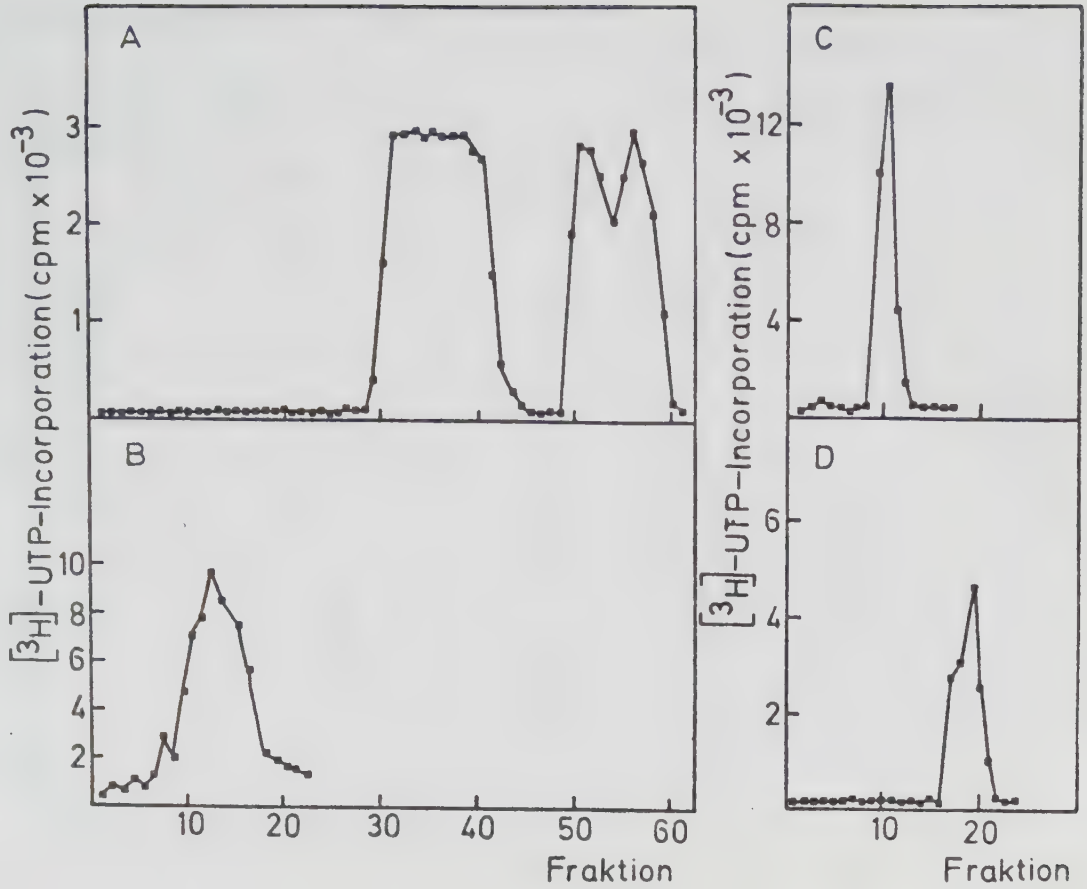
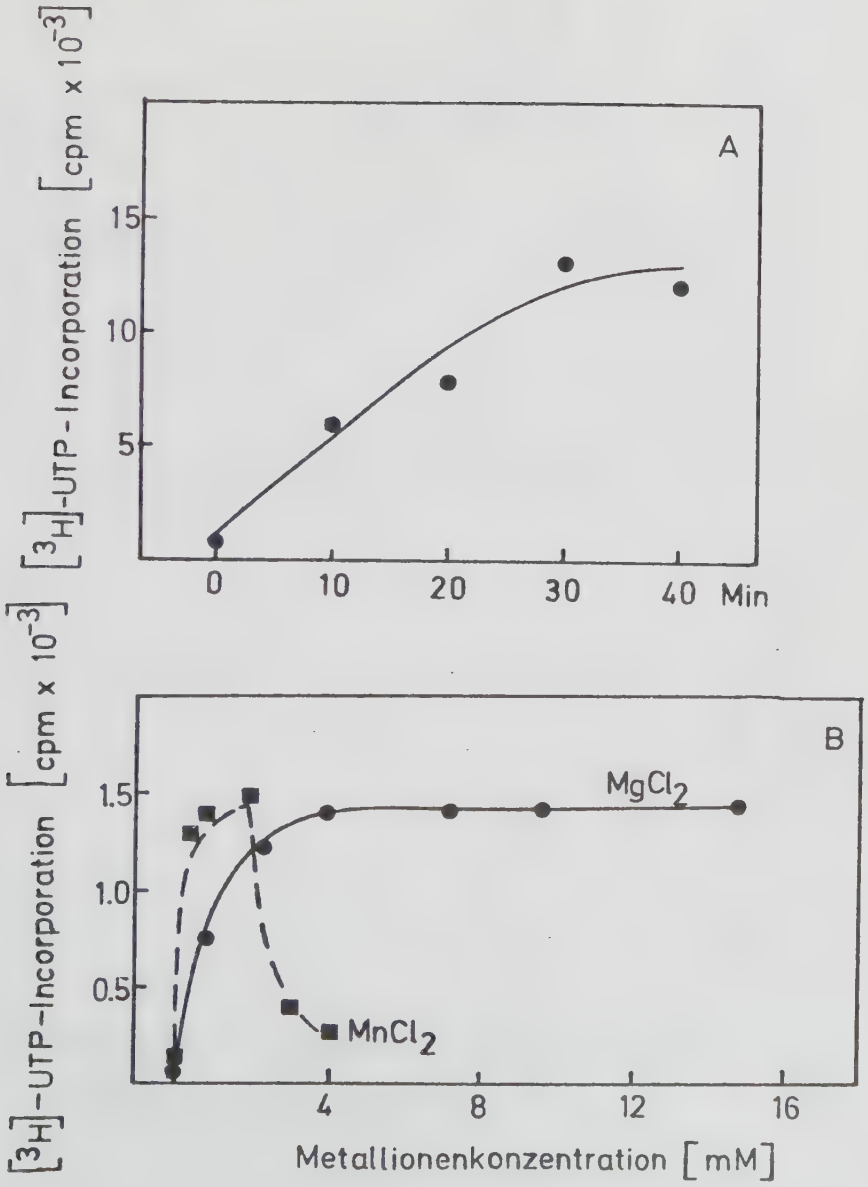
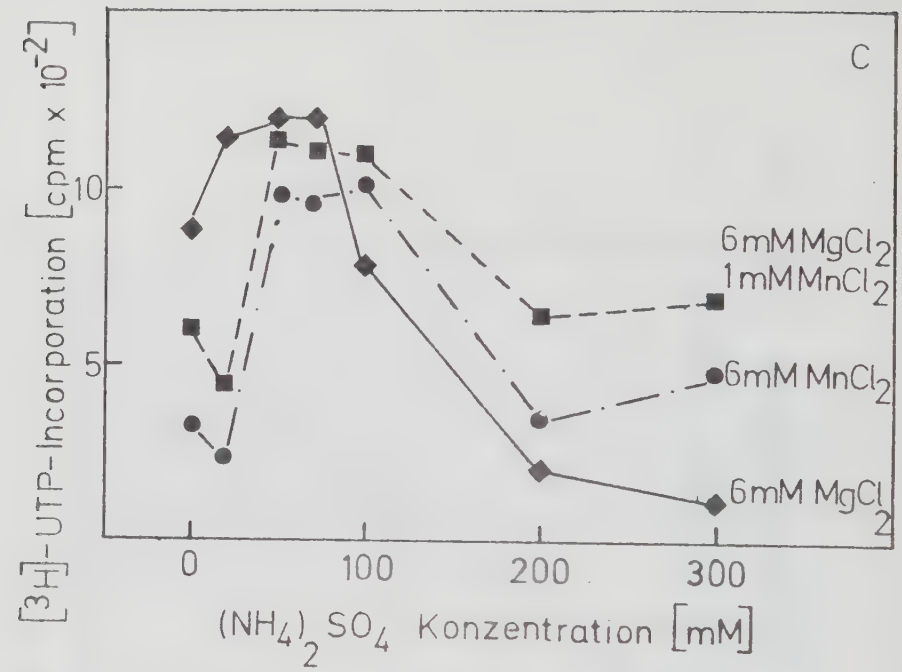

A
B
C
D
[3H]-UTP-Incorporation (cpm x 10-3)
[3H]-UTP-Incorporation (cpm x 10-3)
Fraktion
Fraktion

Abb. 21: Isolierung von RNS-Polymerase I aus Sojabohnen

Sojabohnenchromatin wurde wie unter 2.5.2. beschrieben aufgearbeitet. Der RNS-Polymerase I Rohextrakt wurde über eine Agarosesäule (2.5.1) aufgetrennt (A). Die aktiven Fraktionen des Agaroseeluats wurden auf eine Heparin-Sepharosesäule aufgetragen (0,25 M $(NH_4)_2SO_4$) und dann mit höherem Salz (0,75 M $(NH_4)_2SO_4$) eluiert (B). Die erhaltenen aktiven Fraktionen wurden dann auf eine Ionenkonzentration von 0,05 M $(NH_4)_2SO_4$ eingestellt und über eine DEAE-Säule (2.5.1) fraktioniert (C). Als Abschluß wurden die aktiven DEAE-Fraktionen über eine Phosphocellulosesäule gereinigt (D).


[3H]-UTP-Incorporation [cpm x 10-3]
A
15
10
5
0
10
20
30
40
Min
[3H]-UTP-Incorporation [cpm x 10-3]
B
MgCl2
MnCl2
1.5
1.0
0.5
4
8
12
16
Metallionenkonzentration [mM]


C
[3H]-UTP-Incorporation [cpm x 10-2]
10
5
6mM MgCl2
1mM MnCl2
6mM MnCl2
6mM MgCl2
0
100
200
300
(NH4)2 SO4 Konzentration [mM]

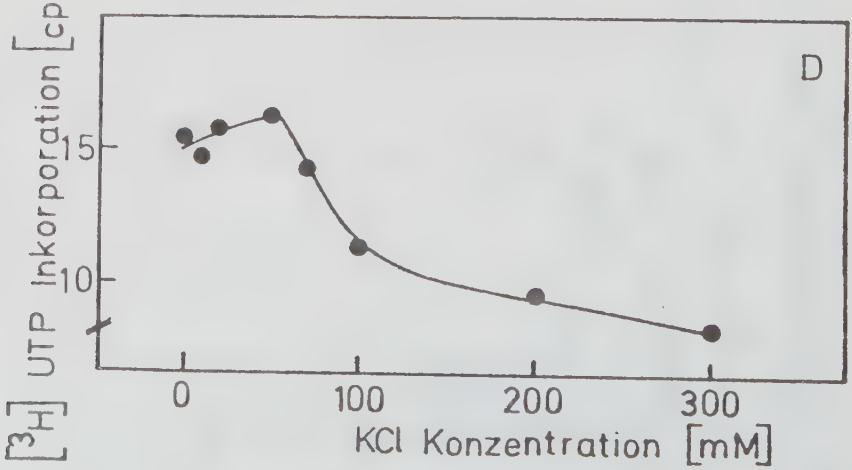

D
[3H] UTP Inkorporation [cpm x10-2]
15
10
0
100
200
300
KCl Konzentration [mM]

Abbildung 22: Optimierung der Ionenbedingungen für den RNS-Polymerase I-Bindungs-Assay.

Nach den in 2.5.1. angegebenen In-vitro-RNS-Synthese-Assaybedingungen wurden die Konzentrationen für Mg^{2+}, Mn^{2+}, NH_4^{2+} und K^+ variiert. Dargestellt sind die Konzentrationsoptimierungskurven für

B $MnCl_2$, $MgCl_2$;
C $(NH_4)_2SO_4$;
D KCl.

In A ist die Zeitabhängigkeit der Polymerisationsreaktion dargestellt.

1,0 und 1,5 mM. Das Konzentrationsoptimum für $(NH_4)_2SO_4$ liegt bei 50 nM (Abb. 22b) und das für KCl ebenfalls bei 50 nM (Abb. 22c).

Von Reznikoff (1975) ist ein Bindungspuffer entwickelt worden, der für Bindungsexperimente mit E.coli-RNS-Polymerase verwendet wurde. Die Ionen- und Salzabhängigkeiten der E.coli Polymerase sind jedoch nicht mit denen von pflanzlichen RNS-Polymerasen I identisch. Aufgrund der oben erhaltenen Daten wurde die Mg^{2+}- und K^+-Konzentration innerhalb des Reznikoff-Puffers geändert. Die Mg^{2+}-Konzentration von 15 mM wurde auf 10 mM und die K^+-Konzentration von 100 mM wurde auf 50 mM verändert.

3.3.2. Bindungsexperimente von Soja-RNS-Polymerase I an die rDNS-Insertion von pFKM 206

Die nach 2,5,4, isolierte $1,4 \times 10^6$ Dalton- rDNS-Insertion wurde unter den nun erstellten Inkubationsbedingungen mit Sojabohnen-RNS-Polymerase I zu verschieden langen Zeiten inkubiert und anschließend mit 4 Basen-Restriktionsenzymen abgebaut. Der Vergleich des Alu-I-Abbaus von nicht vorinkubierter Insert- rDNS mit Soja-RNS-Polymerase I 5 min lang vorinkubierter rDNS ergibt, daß zwei zusätzliche Banden im mit RNS-Polymerase I vorinkubierten Ansatz auftreten (Abb. 23a,b). Die beiden zusätzlichen Banden haben ein Molekulargewicht von 0,60 und $0,79 \times 10^6$ Dalton. Die originalen Banden von 0,16, 0,20, 0,29 und $0,34 \times 10^6$ Dalton nehmen an

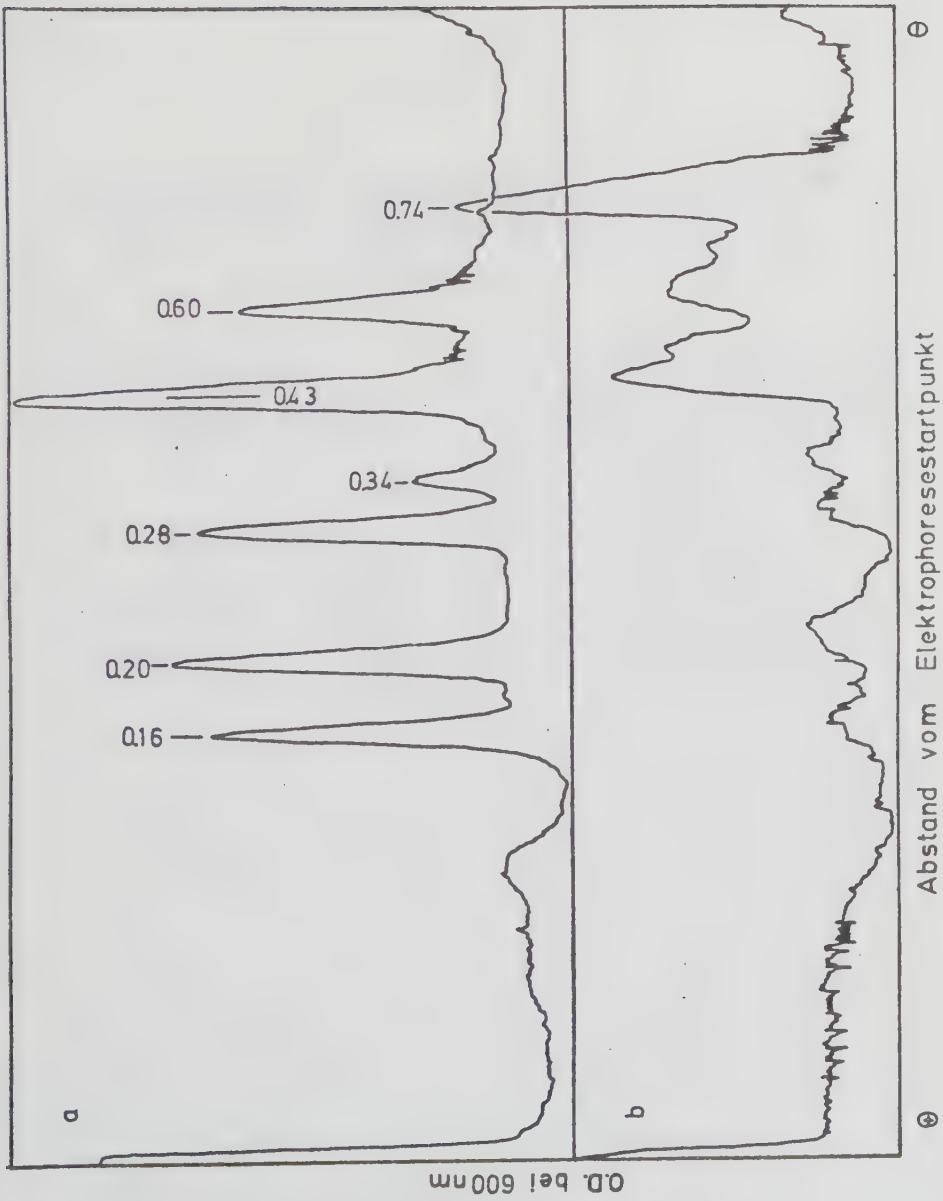

0.74
0.60
0.43
0.34
0.28
0.20
0.16
a
b
⊕
⊖
Abstand vom Elektrophoresestartpunkt
O.D. bei 600nm

Abbildung 23: Maskierung von Alu I-Schnittstellen auf der rDNS-Insertion von pFKM 206 durch Soja-RNS-Polymerase I.

a) 1 µg pFKM 206 rDNS-Insert wurde mit Alu I-Restriktionsendonuklease abgebaut und über ein 3%iges Agarosegel aufgetrennt. Das gefärbte Gel wurde fotografiert und das Polaroidnegativ mit einem Vitatron-Gel-Scanner densitometrisch vermessen.

b) 1 µg pFKM 206- rDNS-Insert wurde, wie in 2.5.5. beschrieben, mit Soja-RNS-Polymerase I für 5 min inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die DNS mit Alu I-Restriktionsendonuklease abgebaut und weiterverarbeitet wie unter a) beschrieben.

Tabelle 11: Alu I-Restriktionsfragmentabbaudaten von pfKM 206 Insert- rDNS mit und ohne RNS-Polymerase I-Vorinkubation

Restriktionsfragmente Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	ohne RNS-Polymerase I-Vorinkubation	mit RNS-Polymerase I-Vorinkubation
0,16	+	+
1,20	+	+
0,28	+	+
0,34	+	+
0,43	+	+
0,48	-	++
0,60	+	+
0,74	-	++

Intensität gegenüber dem normalen Abbau ab. Dies bedeutet, daß die Alu I-Schnittstellen, die die vier Fragmente auf beiden Seiten flankieren, durch die Bindung der RNS-Polymerase I an die rDNS maskiert werden.

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Abbaureaktion dargestellt. Aus den erhaltenen Werten und der Peakhöhe von Abb. 23a und b kann eine Fragmentkarte erstellt werden, die diese Stelle lokalisiert. Aus Abb. 24a ist zu entnehmen, daß die RNS-Polymerase wahrscheinlich die 4. und 5. Alu I-Schnittstelle maskiert, d.h. einen DNS-Doppelstrang-Bereich von mindestens $0{,}16 \times 10^6$ Dalton = 240 Nukleotidpaare bedeckt.

Mit dem 4-Basen-Restriktionsenzym Dde wurden analoge Experimente durchgeführt. In Abb. 25a und b ist der Unterschied zwischen Dde normal abgebauter rDNS und mit Soja-RNS-Polymerase I vorinkubierter und dann mit Dde abgebauter rDNS zu sehen. Die Abbauergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Aus dem Vergleich dieser Daten ergibt sich ein Modell der möglichen Maskierungsstellen durch Soja-RNS-Polymerase I (Abb. 24b). Bei der Lokalisierung der Polymerasebindungsorte mit Dde wird ein nahezu doppelt so großer Bindungsbereich lokalisiert im Vergleich zu den Ergebnissen von Alu I (Abb. 24a): $0{,}31 \times 10^6$ Dalton = 470 Nukleotidpaare. Die beiden Fragmentkarten in Abbildung 24a und 24b lassen sich leider nicht in einen gemeinsamen Zusammenhang bringen, da die Bestimmung des Molekulargewichts der Alu/Dde-Doppelabbaufragmente außerhalb der Fehlergrenze und des Auflösungsvermögens der benutzten Gelsysteme liegt.

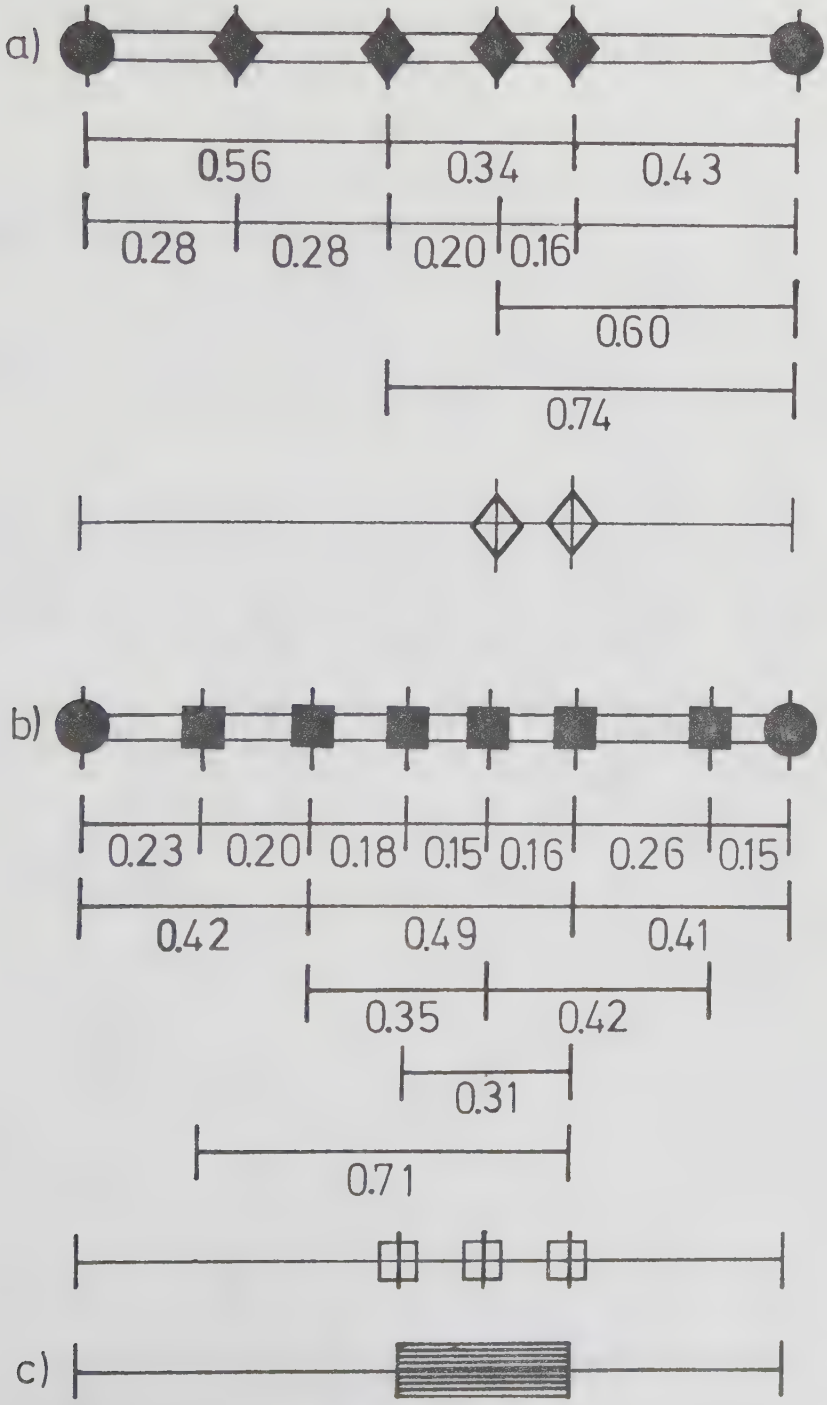

a)
0.56
0.34
0.43
0.28
0.28
0.20
0.16
0.60
0.74
b)
0.23
0.20
0.18
0.15
0.16
0.26
0.15
0.42
0.49
0.41
0.35
0.42
0.31
0.71
c)

Abb. 24: Lokalisierung der RNS-Polymerase I-Bindungsregion auf dem Klonierten Soja-rDNS-Fragment

a) Die in Abb. 23 und Tab. 11 dargestellten Daten sind in dieser Abb. zusammengestellt: Die beiden Alu-Schnittstellen, die das $0{,}16 \times 10^6$ Dalton Fragment begrenzen, werden durch die RNS-Polymerase I maskiert.

b) Die in Abb. 25 und Tab. 12 dargestellten Daten sind in dieser Abbildung zusammengestellt: Die drei Dde-Schnittstellen, die die zwei benachbarten Fragmente von 0,15 und $0{,}16 \times 10^6$ Dalton begrenzen, werden durch die RNS-Polymerase I maskiert.

c) Zusammenfassung der maskierten Alu- und Dde-Schnittstellen zu einer RNS-Polymerase I-Bindungsregion.

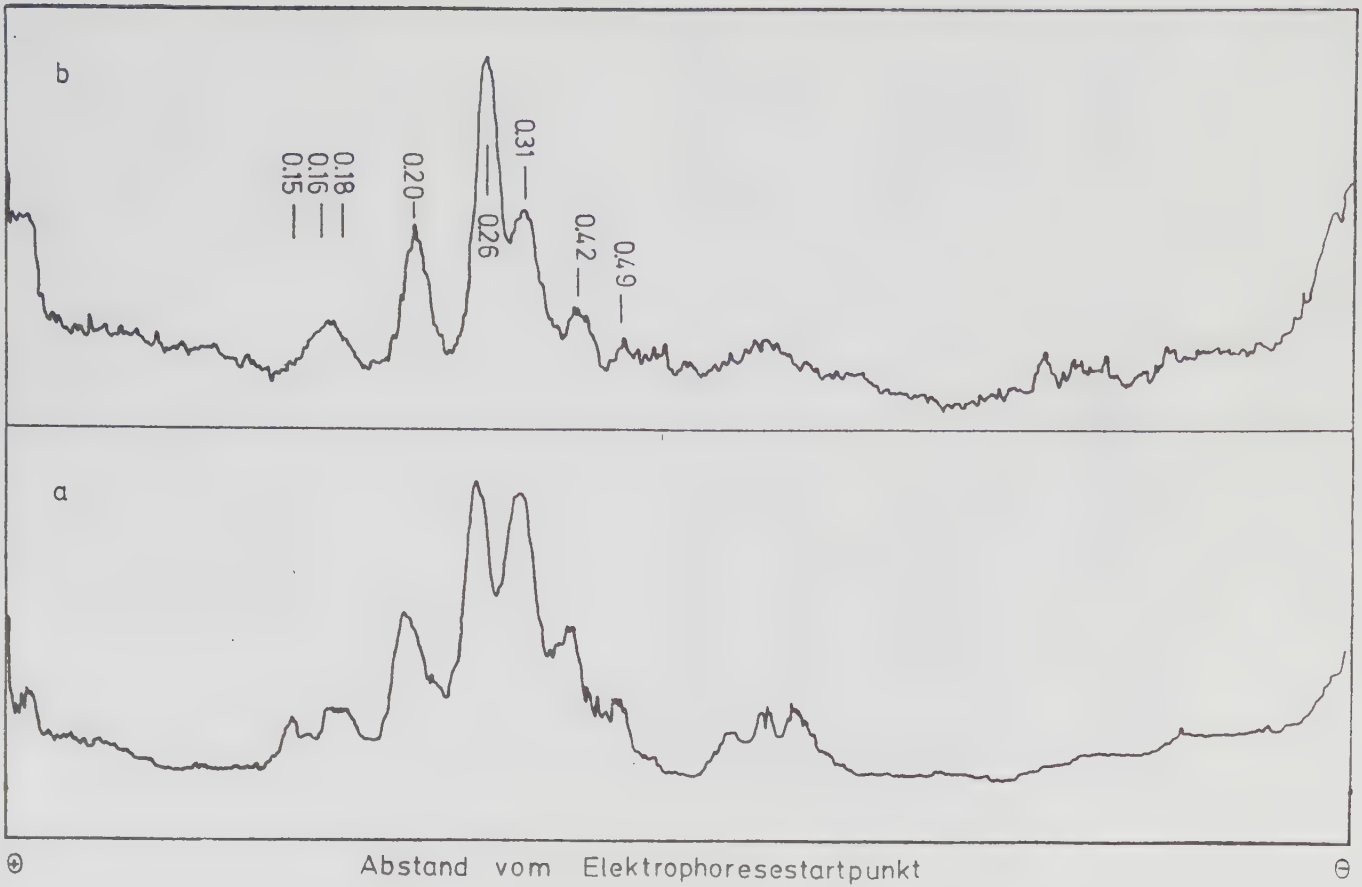

b
a
0.15
0.16
0.18
0.20
0.26
0.31
0.42
0.49
O.D. bei 600nm
⊕
Abstand vom Elektrophoresestartpunkt
⊖

Abbildung 25: Maskierung von Dde-Schnittstellen auf der rDNS-Insertion von pFKM 206 durch Soja-RNS-Polymerase I

a) 1 µg pFKM 206- rDNS-Insert wurde mit Dde-Restriktionsendonuklease abgebaut und über ein 3%iges Agarosegel aufgetrennt. Das gefärbte Gel wurde fotografiert und das Polaroidnegativ mit einem Vitatron-Gel-Scanner densitometrisch vermessen.

b) 1 µg pFKM 206- rDNS-Insert wurde, wie in 2.1, beschrieben, mit Soja-RNS-Polymerase I 5 min inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde das DNS mit Alu I-Restriktionsendonuklease abgebaut und weiterverarbeitet wie unter a) beschrieben

Tabelle 12 Dde-Restriktionsfragmentabbaudaten von pFKM 206 Insert- rDNS mit und ohne RNS-Polymerase I-Vorinkubation

Restriktionsfragmente Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	ohne RNS-Polymerase I-Vorinkubation	mit RNS-Polymerase I-Vorinkubation
0,15	+	+
0,16	+	+
0,18	+	+
0,20	+	++
0,26	+	++
0,31	+	+
0,35	+	+
0,42	+	++

Da von den Schnittstellen der beiden Restriktionsenzyme auf dem rDNS-Molekül durch die RNS-Polymerase I jeweils spezifisch nur ein Teil der insgesamt zur Verfügung stehenden Schnittstellen maskiert wird, ist es sehr wahrscheinlich, daß die maskierte Alu-Region im Bereich der maskierten Dde-Region lokalisiert ist.

Die für diese Bindungsexperimente wichtige Kinetik zur Optimierung der RNS-Polymerase I Inkubationszeiten ist im Anhang dargestellt (6.1.).

3.3.3. Affinitätschromatographie mit dem Plasmid pFKM 206

Wenn die in 3.3.2. beschriebene Bindung zwischen RNS-Polymerase I und dem Plasmid so spezifisch ist, wie mit den oben beschriebenen Experimenten nachgewiesen werden konnte, muß es möglich sein, diese Bindungseigenschaften der RNS-Polymerase an das Plasmid auszunutzen, um die RNS-Polymerase aus einem Pflanzenhomogenat durch Bindung an das Plasmid pFKM 206 zu isolieren.

Zu diesem Zweck wurde die rekombinante Plasmid-DNS an CNBr-aktivierte Sepharose 4 B gebunden (s.2.5.6.1) Die RNS-Polymerase I-aktiven Fraktionen einer Soja-Chromatin-Präparation, die nur über eine Agarosesäule aufgetrennt worden waren (s.2.5.2.), wurden über diese Sepharose-pFKM 206-Säule fraktioniert. Das Elutionsprofil ist in Abb. 26 zu sehen. Es ist zu erkennen, daß der überaus größte Teil des Gesamtproteins der aufgetragenen Proteinlösung nicht an die Säule bindet. Allerdings läuft auch etwa ein Drittel der aufgetragenen RNS-Polymerase-Gesamtaktivität durch und bindet nicht. Nach dem Spülen und Waschen der Säule treten keine aktiven Fraktionen im Durchlauf auf. Dies bedeutet, daß der Teil

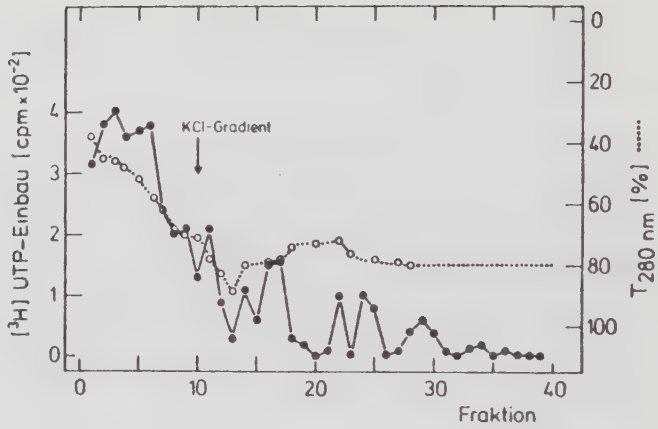


Abbildung 26: Affinitätschromatographie der Soja-RNS-Polymerase I an der rDNS-Sepharose-Säule

Die nach 2.5.6.1. hergestellte rDNS-Sepharose-Säule wurde mit einer angereicherten RNS-Polymerase I-Fraktion (aktive Fraktion nach Agarose-Säule, s. 2.5.2.) beladen und wie unter 2.5.6.2. beschrieben eluiert. Jede aufgefangene Fraktion wurde einem Aktivitätstest auf RNS-Polymerase I unterzogen.

3.4. Komplexität der poly A^+- und poly A^--RNS aus der Sojabohne

Nach der Kartierung ribosomaler Gene aus verschiedenen höheren Pflanzen und der Klonierung von Soja- rDNS in E.coli ist es nun interessant zu überprüfen, ob noch andere Möglichkeiten bestehen, einzelne definierte Gene aus einem Gesamtgenom zu charakterisieren. Der oben beschriebene experimentelle Weg ermöglichte die Charakterisierung der ribosomalen Repeating-Units, da sich die für die spezifische Hybridisierung erforderliche komplimentäre RNS-Sequenz (rRNS) homogen isolieren läßt. Außerdem begünstigt der Repetitionsgrad der zu charakterisierenden rDNS die Reaktionsgeschwindigkeit der Hybridisierung.

Der Charakterisierung von Unique-Sequenzen durch spezifische Southern-Hybridisierungen stehen zwei grundsätzliche experimentelle Hindernisse entgegen:

(1) Eine sequenzspezifische homogene mRNS aus der mRNS-Gesamtpopulation des Cytoplasmas läßt sich nur unter großem experimentellen Aufwand isolieren.

(2) Eine spezifische Unique-Sequenz läßt sich auf Grund des ihr eigenen $C_o t_{1/2}$-Wertes durch Hybridisierung nur sehr schwer charakterisieren.

Die hier vorliegenden Experimente sollen die Fragestellung bearbeiten, ob über eine Fraktionierung der RNS und anschließende Hybridisierung an restriktionsenzymabgebaute DNS-Fragmente eine Identifizierung spezifischer Gene möglich ist.

Zu diesem Zweck ist es wichtig, eine Isolierungsmethode zu verwenden, die zu einer RNS-Präparation frei von jeglicher Kontamination führt. Hier wurde eine Methode verwendet, die die Gesamt-RNS von den übrigen Bestandteilen des Zellaufschlusses (nach Phenolextraktion) durch Pelletieren im CsCl-Gradienten (Glisin et al., 1974) abtrennt. Proteine, DNS und Polysaccharide banden in diesen Gradienten entsprechend ihrer jeweiligen Dichte, während die RNS sauber pelletiert. Nach der Fraktionierung in poly A^+- und poly A^--RNS über oligo dT-Cellulose wurden beide RNS-Arten in vitro markiert mit ^{125}Jod. Mit der poly A^--RNS wurde eine spezifische Aktivität von $7{,}5 \times 10^6$ CPM/µg erreicht, während sie für die poly A^+-RNS nur $8{,}3 \times 10^5$ CPM/µg betrug.

Die Auftrennung der beiden RNS-Spezies über präparative Agarosegele führte an den in Abb. 27 dargestellten Ergebnissen.Die poly A^+-RNS besteht aus 17 Komponenten von einer Größe von $0{,}05 \times 10^6$ bis $0{,}32 \times 10^6$ Dalton, während die poly A^--RNS in vier Hauptfraktionen aufspaltet: 4 S RNS,5 S, 18 S-und 25 S -rRNS. Zwischen der 5 S- rRNS und der 18 S- rRNS befinden sich verschiedene Fraktionen, jedoch in sehr viel geringerer Menge im Vergleich zu den vier Hauptfraktionen. Das Elutionsbild der poly A^+-RNS zeigt, daß im Bereich der 18 S-und 25 S- rRNS keine nachweisbare Menge an RNS vorhanden ist. Die Hybridisierung der einzelnen RNS-Fraktionen an Southern-eluierte Gesamtsoja-DNS, die mit Restriktionsenzymen abgebaut worden war, ergab die folgenden Ergebnisse (Tab. 13).

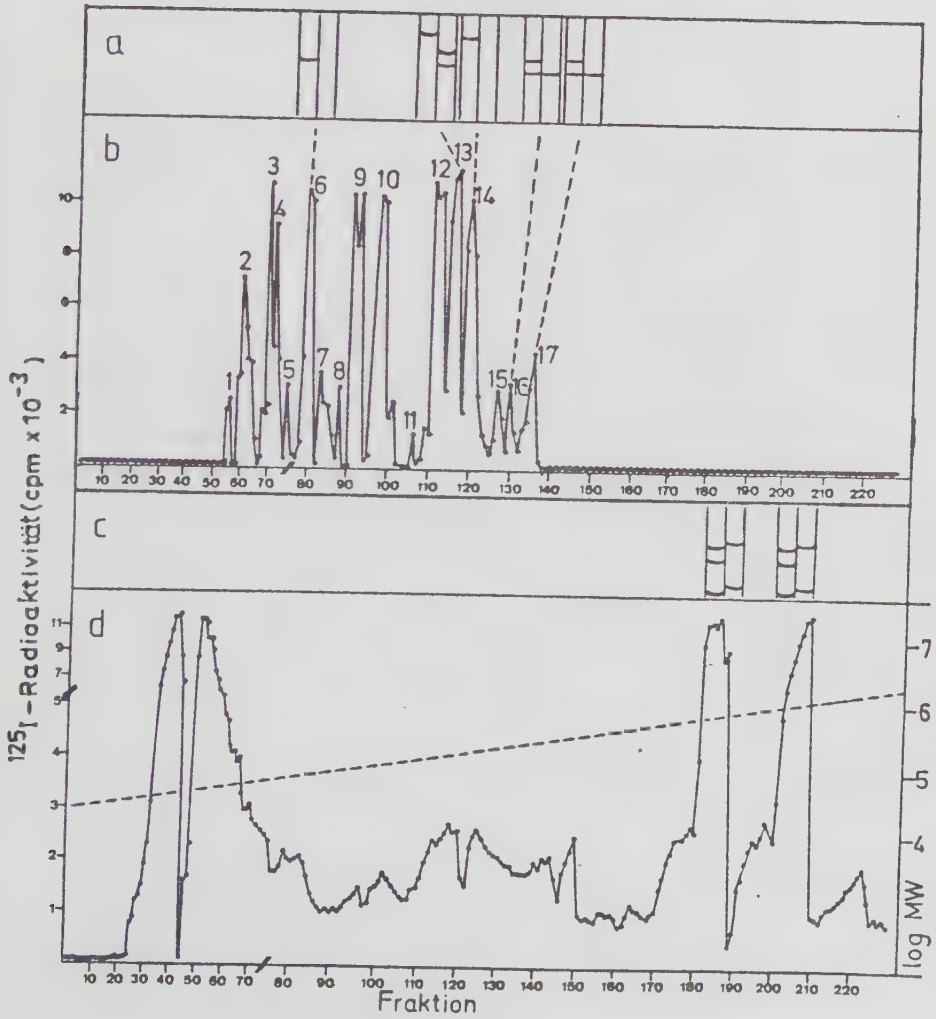

a
b
c
d
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
^{125}I-Radioaktivität (cpm x 10^{-3})
log MW
Fraktion

Abb. 27: Komplexität von poly A^+-und poly A^--RNS aus der Sojabohne

Poly A^+- und poly A^--RNS wurden aus Sojazellen isoliert wie unter 2.6. 3.2. - 2.6 3.4 beschrieben ist. Danach erfolgte eine Markierung mit ^{125}J (2.6.4.). Jeweils 4mg poly A^+ RNS (Abb. 27b) und 8mg poly A^- RNS (Abb. 27d) wurden über eine präperative Elektrophorese aufgetrennt (2.6.5.1). Jede der nach der Auftrennung erhaltenen Peak-Fraktionen (Komponenten, s.Tab. 13) wurden jeweils gegen Gesamt-Soja-DNS hybridisiert, die ihrerseits mit Restriktionsenzymen gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und eluiert worden war. Die Teilabbildung 27a und c geben die Hybridisierungsbanden der jeweiligen RNS-Fraktionen mit restriktionsfragmentierter Gesamt-DNS wieder.

Tabelle 13 Hybridisierungsergebnisse der vorfraktionierten poly A^+ RNS mit Restriktionsendonuklease abgebauter Gesamt-Soja-DNS

Fraktion	Komponente	Hybridisierungsfragmente Molekulargewicht ($\times 10^6$ Dalton)	Restriktionsenzym
78-82	6	1,7	Bam HI
111-114	12	7,1	Bam HI
		2,7	Eco RI
		0,6	Eco RI
115-118	13	8,9	Bam HI
129-132	16	2,3	Bam HI
		1,6	Bam HI
		1,6	Eco RI
133-136	17	2,3	Bam HI
		1,6	Eco RI
		1,6	Eco RI

Fünf Fraktionen der poly A^+-RNS geben positive Hybridisierungsergebnisse mit Gesamt Soja-DNS. Die Komponente 5 (Abb. 28), hybridisiert an ein DNS-Fragment von $1,7 \times 10^6$ Dalton. Dieses Fragment entsteht nach Bam HI-Abbau. Die gleiche Komponente hybridisiert nicht mit Eco RI abgebauten DNS. Die Komponente 12 hybridisiert mit einem Bam HI-Fragment von $7,1 \times 10^6$ Dalton und zwei Eco RI-Fragmenten von 2,7 und $0,6 \times 10^6$ Dalton. Die RNS aus Komponente 13 hybridisiert mit dem Bam HI geschnittenem DNS-Fragment von $8,9 \times 10^6$ Dalton. Die gleiche Komponente hybridisiert nicht mit Eco RI-abgebauten DNS-Fragmenten. Die Komponenten 16 und 17 zeigen ein identisches Hybridisierungsmuster. Mit Bam HI abgebauter Gesamt - Soja DNS wird eine Hybridisierungsbande von $2,3 \times 10^6$ und $1,6 \times 10^6$ Dalton erhalten. Eco RI fragmentierte DNS ergibt jeweils eine Hybridisierungsbande von $1,6 \times 10^6$ Dalton mit diesen Fraktionen.

Die poly A^--RNS Fraktionen ergeben positive Hybridisierungsergebnisse mit restriktionsabgebauter Gesamt Soja-DNS nur im Bereich der Fraktionen von 18 S-und 25 S - rRNS. Die Hybridisierungsbanden für Bam HI und Eco RI sind mit denen der ribosomalen DNS (Friedrich et al., 1979) identisch. Die Fraktionen im 4 S und 5 S- rRNS-Bereich und auch die Fraktionen im Bereich von größer als 5 S und kleiner 18 S ergeben keine Hybridisierungsbanden mit Gesamt Soja-DNS.

4. Diskussion

4.1. Kartierung von ribosomalen RNS-Genen

Die ribosomalen Gene werden als ein Modell zur Untersuchung der Struktur, Funktionsweise und Regulation eines Gens angesehen. Deshalb zählen die ribosomalen Gene zu den untersuchten Genen bei den Eukaryonten.

Grundlegende Arbeiten zur Struktur der Gene wurden beim Seeigel (Birnstiel et al., 1971) und bei Drosophila melanogaster vorgenommen (Glover and Hogness, 1977; White and Hogness, 1977; Wellauer and David, 1977; Barnett and Rae, 1979; Graziani et al., 1977; Glover 1977).

Die ribosomalen Gene der Maus wurden ebenfalls charakterisiert (Corry and Adams, 1977; Grummt et al., 1979). Von niederen Eukaryonten wie Tetrahymena (Engberg et al., 1976), Dictyostelium (maizels et al., 1976), Hefe (Meyerink et al., 1976) und Neurospora crassa (Free et al., 1979) stehen ebenfalls Daten über die Struktur der ribosomalen Gene zur Verfügung. Die ribosomalen Gene der genetisch teilautonomen Organellen (Chloroplasten und Mitochondrien) wurden ebenfalls von mehreren Arbeitsgruppen charakterisiert (Knopf und Stutz, 1978; Jenni und Stutz, 1978; Hatin et al., 1979).

Die rDNS von höheren Pflanzen wurde nicht sehr intensiv untersucht. Bisher liegen Arbeiten über die Struktur der rDNS von der Sojabohne, Glycine max.

(Friedrich et al., 1979; Varsamyi-Breiner et al., 1979) und dem Reis (Dono et al., 1980) vor. Dies war einer der Gründe, die rDNS weiterer höherer Pflanzen zu charakterisieren. Bei tierischen Objekten, wie z.B. Drosophila (Wellauer and David, 1977) wurden Heterogenitäten in den Coding-Sequenzen für die rRNS nachgewiesen. Zudem liegen in tierischen Systemen Längenheterogenitäten im Spacerbereich vor. Die hier untersuchten beiden Brassica-Sorten zeigen im Hybridisierungsmuster für alle Restriktionseinzelabbaue scharfe Banden. Dies schließt eine Heterogenität im Coding-Bereich aus. Der Doppelabbau liefert ebenfalls nur scharfe Banden, die sich eindeutig in das aus dem Einzelabbau aufgestellten Fragmentierungsschema einpassen.

Der Vergleich des Hybridisierungsmusters der beiden Sorten "Honkong" und "Granat" von Brassica pekinensis zeigt nahezu vollständige Übereinstimmung. Das Fehlen einer eindeutigen Bande im Hind III-Abbau bei der Sorte "Honkong" könnte möglicherweise durch einen Unterschied in der Methylierung der rDNS-Repeating-Unit zwischen der Sorte "Granat" und Honkong" erklärt werden. Da pro Repeating-Unit nur eine Hind III-Schnittstelle vorhanden ist, fällt ein geringer Unterschied im Methylierungsgrad eher auf im Vergleich zu den anderen Restriktionsenzymen, die mehrmals innerhalb einer Repeating-Unit schneiden. Da Hind III nur einmal pro Gen schneidet, stellt die Größe des Hind III-Fragments zugleich die Größe der Repeating-Unit dar: $6{,}2 \times 10^6$ Dalton.

Unabhängig von diesen Untersuchungen an Brassica

pekinensis wurden am Botany Department in Edinburgh von M. Lockyer Restriktionskartierungsexperimente an anderen Brassica-Arten vorgenommen. Die Ergebnisse zeigen, daß die untersuchten Brassica-Arten auch nur eine Hind III-Schnittstelle pro Repeating-Unit besitzen. Die Größe der Repeating Unit für Brassica campestris beträgt 6,3 - 6,4 x 10^6 Dalton, die für Brassica oleracea 6,8 x 10^6 Dalton (pers. Mitteilung).

Die Daten der Hybridisierung von Brassica pekinensis lassen die Aufstellung eines Kartierungsmodells (Abb. 5) zu. Die Richtigkeit dieses Modells kann nur über die Klonierung dieses Gens überprüft werden. Die Übereinstimmung von drei unabhängigen Einzelabbaureaktionen und den Doppelabbauergebnissen lassen das Modell als sehr gesichert erscheinen.

Die Fragmente des Bam HI-Abbaues ergeben aus der Kombination von vollständigen und unvollständigen Abbaubanden ein Kartierungsmodell für Bam HI (Abb. 5a), das einer Verifizierung durch andere Daten bedarf. Die Eco RI-Abbauergebnisse führen zu einem Kartierungsmodell mit einer Repeating-Unit-Größe, die mit der durch Hind III und Bam HI ermittelten von 6,2 x 10^6 Dalton gut übereinstimmt.

Der Doppelabbau der drei Restriktionsenzyme verschieden miteinander kombiniert, bestätigen aufgestellte Modell einer Repeating-Unit-Größe von 6,2 x 10^6 Dalton und legen zudem die relativen Abstände der einzelnen Schnittstellen zueinander innerhalb der Repeating-Unit fest. Zusätzlich zeigen die

scharfen Banden des Doppelabbaus, daß keine Sequenzheterogenitäten innerhalb der Nachweisgrenze der benutzten Methode vorliegen.

Die Lokalisation der 18 S und 25 S-Coding-Bereiche innerhalb der Repeating-Unit führte zu den in Abb. 6 dargestellten Ergebnissen. Die Größe des nichttranskribierten Spacers zwischen zwei Repeating-Units ergibt sich aus der Subtraktion der Länge des rRNS-Precursors (ausgedrückt als Länge des DNS-Doppelstrangs) von der Gesamtlänge der Repeating-Unit. Die Precursorlänge für rRNS bei der Brassicaceae Matthiola incana beträgt $2{,}2 \times 10^6$ Dalton (H. Grierson und Hemleben, 1977), d.h. $4{,}4 \times 10^6$ Dalton DNS-Doppelstrang. Dieser Wert ergibt einen nichttranskribierten Sequenzrest von $1{,}8 \times 10^6$ Dalton. Verglichen mit tierischen Systemen (Blin et al., 1979, Campell et al., 1979) ist dieser Wert klein. Eine andere bisher untersuchte Pflanze, die Sojabohne (Friedrich et al., 1979), zeigt einen ähnliche großen Wert für den nichttranskribierten Spacer.

Der Bereich zwischen 18 S und 25 S rRNS-Gen, d.h. der transkribierte Spacer, ist nicht exakt zu bestimmen, da dies vom Vorhandensein der Restriktionsschnittstellen abhängig ist. Der 25 S - rRNS-Codingbereich besitzt eine Kartierungsunschärfe von $0{,}4 \times 10^6$ Dalton.

Die Kartierung der rDNS-Repeating-Unit einer weiteren Brassicea Matthiola incana, verlief nach dem gleichen Arbeitsschema. Die Kombination der Ergebnisse aus dem Einzel- und Doppelabbau ist im Kartierungs-

modell (Abb. 7) dargestellt. Ein Vergleich der Anordnung der verschiedenen Fragmente der beiden Brassicaceen bietet sich an: Die Größe der Repeating-Units von 6,2 (Brassica) und 6,1 (Matthiola) x 10^6 Dalton kann als nahezu identisch angesehen werden. Die Größe des Unterschiedes liegt etwa im Bereich der Fehlergrenze beim Bestimmen des Molekulargewichts aus Agarosegelen. Die Anordnung der Bam HI- und Eco RI-Schnittstellen relativ zu den von Hind III ist jedoch verschieden zwischen Brassica und Matthiola. Gemeinsamkeiten liegen bei der Begrenzung der jeweiligen Coding-Bereiche vor. Die 18 S Coding-Region wird bei Brassica von zwei Eco RI Schnittstellen begrenzt, die ein Eco RI-Fragment von 2,2 x 10^6 Dalton erzeugen, bei Matthiola ist dieses Eco RI-Fragment 2,0 x 10^6 Dalton groß. Innerhalb dieses Eco RI-Fragmentes treten jedoch größere Unterschiede auf. Das 2,2 x 10^6 Dalton Eco RI-Fragment von Brassica, das die 18 S-Coding-Region beinhaltet, wird von zwei Bam HI-Schnittstellen unterteilt, von denen eine dieser Bam HI-Schnittstellen außerhalb des codierenden Sequenzbereiches liegt. Die andere Bam HI-Schnittstelle spaltet den 18 S-Coding-Bereich in zwei ungleiche Teile von etwa 2/3 und 1/3 der Gesamtlänge. Bei Matthiola ist die Lage der 18 S-Coding-Region unscharf determiniert. Die 18 S-Coding-Region ist um 0,6 - 0,7 x 10^6 Dalton kürzer als das zur Verfügung stehende Eco RI-Fragment. Wenn man annimmt, daß die Coding-Region in diesem Eco-RI-Fragment linksbündig angeordnet ist, dann schneidet die zusätzliche Bam HI-Schnittstelle die Coding-Region analog zu den Daten von Brassica.

Die 25 S-Coding-Region wird bei beiden Brassicaceen auf beiden Seiten von je einer Eco RI-Schnittstelle begrenzt. Das Fragmentierungsmuster innerhalb dieser Eco RI-Schnittstellen ist verschieden. Bei Brassica sind je eine zusätzliche Eco RI- und Bam HI-Schnittstelle vorhanden, bei Matthiola zwei Bam HI-Schnittstellen. Somit besteht ein relativ großer struktureller Unterschied innerhalb der gesamten rRNS-Repeating-Unit und der rDNS-Coding-Regionen zwischen zwei verschiedenen Brassicaceen.

Die nächste untersuchte höhere Pflanze war Phaseolus aureus. Die Größe der rDNS-Repeating-Unit beträgt $6{,}1 \times 10^6$ Dalton, ähnlich wie dür die nahe Verwandte Glycine max. (Sojabohne) mit einer rDNS-Repeating-Unit von $5{,}9 \times 10^6$ Dalton (Friedrich et al., 1979). Die Größe für Phaseolus-rDNS ist gering verschieden von der von Glycine. Die Erbegnisse einer Soja rDNS-Fragment-Klonierung mit dem Phagen λ lassen auf eine Repeating-Unit-Größe von $5{,}2 \times 10^6$ Dalton schließen (Varsanyi-Breiner et al., 1979).

Der Vergleich der Fragmentkarte zwischen Phaseolus und Glycine weist Gemeinsamkeiten nur im 18 S rRNS-Coding-Bereich auf. Die Eco RI/Bam HI-Doppelabbaubande von $0{,}8 \times 10^6$ Dalton in der Glycine max.-Repeating-Unit findet sich ebenfalls bei Phaseolus. Die Anordnung der Restriktionsschnittstellen im 25 S rRNS-Coding-Bereich ist für beide Pflanzen sehr verschieden.

Die höhere Pflanze Cucumis melo überrascht durch die Größe der Repeating-Unit von $7{,}7 \times 10^6$ Dalton. Die spezifische Hybridisierung der Coding-Regionen

führte zu dem in Abb. 9 dargestellten Modell. Dieses Modell impliziert einen transkribierten Spacer zwischen der 18 S und 25 S Coding-Region von $1,6 \times 10^6$ Dalton. Dies erfordert somit eine minimale rRNS-Precursorlänge von mindestens $2,6 \times 10^6$ Dalton (einzelsträngige RNS). Eine Vergrößerung der Precursormoleküls über die Enden der jeweiligen 18 S und 25 S Coding-Region hinaus, würde die Größe des rRNS-Precursormoleküls auf etwa $3,0 - 3,4 \times 10^6$ Dalton (einzelsträngige RNS) anwachsen lassen. Ein solches pflanzliches rRNS-Precursormolekül wurde bisher nur für Gewebe-Kulturzellen von Ahorn (Cox et al., 1973) und Petersilie (Richter, 1973) beschrieben. Angaben über pflanzliche Precursorgrößen liegen zwischen $2,1 \times 10^6$ Dalton bis $2,5 \times 10^6$ Dalton. Der Nachweis eines hochmolekularen RNS-Moleküls erweist sich dann als sehr schwierig, wenn das Processing sehr schnell abläuft und somit die Halbwertszeit dieses Zwischenprodukts sehr kurz ist.

Eine Untersuchung an der Melone in unserem Labor ergab Größen von zwei Precursormolekülen von 1,82 und $1,60 \times 10^6$ Dalton (Hemleben, persönliche Mitteilung).

Die Analyse der Verteilung der Restriktionsschnittstellen innerhalb der Cucumis-Repeating-Unit im Vergleich mit der Anordnung der bisher untersuchten Repeating-Units ergibt keine auffälligen Gemeinsamkeiten. Alle bei der Untersuchung von Cucumis erhaltenen Banden sind scharf und homogen, auch beim Doppelabbau sind keine Unschärfen oder Aufspaltungen der Banden zu sehen. Auch bei dieser Pflanze kann davon ausgegangen werden, daß innerhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methode alle untersuchten

Repeating-Units identisch sind.

Neuere Untersuchungen in unserem Labor deuten allerdings darauf hin, daß bei Cucumis melo rDNS doch unterschiedlich große Repeating-Units vorkommen, ähnlich wie für den Reis (Oono et al., 1980) beschrieben.

Betrachtet man die Kartierungsergebnisse der verschiedenen Pflanzen (Abb. 29), so wird deutlich, daß nur zu einem geringen Teil Übereinstimmungen bestehen. Da die unterschiedliche Lokalisation der Restriktionsschnittstellen durch eine unterschiedliche Basensequenz bedingt ist, läßt sich dadurch auf den Grad der Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Pflanzen schließen. Wäre die Basensequenz innerhalb der rDNS statistisch angeordnet, so bestünde bei einer Repeating-Unit-Größe von $6{,}1 \times 10^6$ Dalton (9242 Basenpaare) eine Wahrscheinlichkeit von 2,25 Restriktionsschnittstellen pro Repeating-Unit für ein 6-Basen Restriktionsenzym. Das Restriktionsenzym Hind III besitzt in allen untersuchten Repeating-Units nur eine Schnittstelle, also weniger als theoretisch möglich, während Bam HI und Eco RI mehr Schnittstellen besitzen. Diese Unterschiede in der Häufigkeit sind nicht nur auf die $E_r$kennungsregion zurückzuführen. Die rDNS-Sequenz ist GC-reich gegenüber dem Gesamtdurchschnitt der Genom-DNS. Dies kann nur die geringe Schnitthäufigkeit von Hind III (Erkennungsregion AAGCTT) erklären, nicht jedoch die höhere Anzahl von Eco RI-Schnitten (Erkennungsregion GAATTC). Bam HI besitzt eine Spezifität für GGATCC. Dies erklärt die hohe Anzahl der Schnittstellen inner-

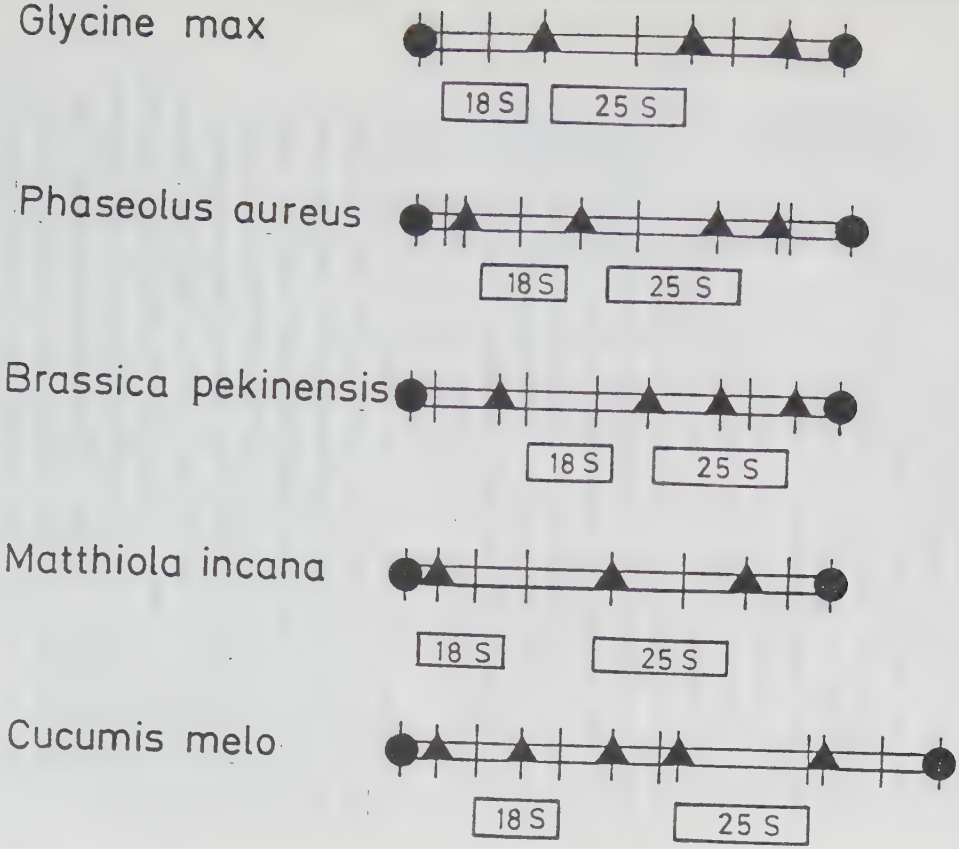


Abbildung 28: Zusammenstellung der Restriktionsfragmentkarten der fünf untersuchten Pflanzen.

halb der Repeating-Unit. Unterschiede im Restriktionsmuster einer DNS-Sequenz entstehen dadurch, daß in der analogen DNS-Sequenz mindestens eine Basenänderung innerhalb der 6-Basen-Erkennungsregion eintritt und an anderer Stelle durch die Änderung mindestens einer Base eine neue Restriktionsschnittstelle entsteht. Wenn eine Sequenzänderung eintritt, so kann sie nicht nur im Bereich der Schnittstelle sondern über die ganze Repeating-Unit verteilt liegen. Ausgehend von dieser Annahme, daß eine Schnittstelle für ein 6-Basen-Restriktionsenzym nur entsteht oder verschwindet bei Änderung mindestens eines Basenpaares der 6-Basenpaarerkennungsregion und daß eine solche Basenänderung gleichmäßig über alle Repeating-Units verteilt ist, bedeutet dies, daß sich die Basensequenzen der rDNS-Repeating-Unit bei den verschiedenen Pflanzenspezies um etwa 16% unterscheiden können.

Sequenzunterschiede in diesem Ausmaß sind durchaus möglich, ohne daß die biologische Funktion der rRNS beeinträchtigt wird. Die beiden rRNS-Spezies haben strukturelle Aufgaben innerhalb des Ribosoms, d.h. innerhalb der Gesamtlänge eines rRNS-Moleküls liegen Sequenzbereiche, die für die Bindung von Proteinen verantwortlich sind. Diese Bereiche sind von äußerster Wichtigkeit für die biologische Funktion des Ribosoms. Änderungen dieser Sequenzanteile haben eine Veränderung der Tertiärstruktur der Ribosomenuntereinheiten zur Folge (Wittmann, 1976). Die übrigen Sequenzanteile innerhalb des rRNS-Moleküls dienen der Abstandhaltung zwischen den einzelnen Regionen der Protein-RNS Bindungsorte (Brima Combe et al., 1978). Wenn also Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Pflanzen innerhalb der rRNS-Sequenz auftreten, so liegen sie

aller Wahrscheinlichkeit nach im Bereich der rRNS-Sequenz, die nicht an der Proteinbindung beteiligt ist. Ein Selektionsdruck bei eventuellen Mutationen in diesem Sequenzbereich bewirkt nur eine Konstanthaltung der physikalischen Länge in diesem Abschnitt, während Mutationen im Proteinbindungsbereich nach der Bindungseffektivität dieser rRNS-Sequenzbereich selektioniert werden. Der Anteil der sequenzkonstanten Anteile innerhalb des 18 S rRNS-Moleküls ist größer als innerhalb der 25 S rRNS. Die 18 S rRNS bewirkt nicht nur durch ihre eigene Sequenz die Anordnung der Proteine innerhalb der kleinen Ribosomenuntereinheit, sondern besitzt innerhalb ihrer Sequenz Bereiche, die in direkte Interaktion mit der mRNS und tRNS beim Translationsmechanismus treten. Dies könnte die größere Übereinstimmung der jeweiligen 18 S rRNS Coding-Regionen bei den verschiedenen Pflanzen erklären, während im 25 S-rRNS -Coding-Bereich keine Übereinstimmungen im Fragmentierungsmuster festzustellen sind (Abb. 29). Von besonderem Interesse ist, daß alle untersuchten rDNS Repeating-Units jeweils nur eine Hind III-Schnittstelle besitzen.

Abschließend ist noch darauf hinzuweisen, daß die Restriktionsfragmentstruktur der durch CsCl-Actinomycin D-Gradienten angereicherten rDNS durch Hybridisierung charakterisiert wurde. Diese Hybridisierungsbanden entsprechen nicht der Gesamtheit der Äthidiumbromid anfärbbaren DNS-Banden nach Restriktionsabbau. Wie weitere Ergebnisse in unserer Gruppe zeigten, ergibt der Restriktionsabbau von angereicherter rDNS bei Brassica, Cucumis und Phaseolus mehr anfärbbare Abbaubanden als nachweisbare Hybridisierungsbanden.

Dies deutet daraufhin, daß sich in der angereicherten rDNS-Fraktion noch zusätzliche Sequenzen befinden. Die hier diskutierten Fragmentkarten wurden nur durch positive Hybridisierungen der abgebauten angereicherten rDNS mit markierter ribosomaler rRNS erstellt. Banden, die im anfärbbaren Bandenmuster enthalten sind und nicht hybridisieren, wurden nicht für die Kartierungsmodelle berücksichtigt.

Die Untersuchung an angereicherter rDNS von Brassica und Matthiola auf eventuell enthaltene 5 S rRNS-Coding-Sequenzen verlief negativ. Dies kann entweder darauf beruhen, daß bei der Anreicherung der rDNS über Actinomycin D-Gradienten die 18 S - 25 S rRNS Gene von den 5 S rRNS-Genen abgetrennt werden, oder daß bei der Fragmentierung der 5 S rRNS-Coding-Region durch Restriktionsenzyme sehr kleine DNS-Schnittstücke entstehen, die in den durchgeführten Agarosegelsystemen nicht mehr nachweisbar sind. Arbeiten von Grierson und Hemleben (1978) haben gezeigt, daß bei Verwendung von hochmolekularer DNS (größer als 10^7 Dalton) die 18 S- und 15 S- und die 5 S rRNS Hybridisierungspeaks im CsCl-Actinomycin D-Gradienten nicht koinzidieren. Damit gewinnt die erste Erklärungsmöglichkeit für die Nichtauffindbarkeit der 5 S-Coding-Region an Aussagekraft. Die Lage der 5,8 S rRNS-Coding-Sequenz ist noch nicht identifiziert.

4.2. Klonierung von ribosomalen RNS-Genen

Ausgehend von den Restriktionskartierungsergebnissen der Sojabohne (Friedrich et al., 1979) sollte versucht werden, die rDNS-Repeating-Unit zu klonieren. Verschiedene Klonierungsmethoden wurden angewandt, um dieses Ziel zu erreichen.

Die Klonierungsexperimente mit vorfraktionierter Soja- rDNS führten zu negativen Ergebnissen. Da eine DNS vom Ausgangsmolekulargewicht $3{,}8 \times 10^6$ Dalton eingesetzt wurde, aber nur Klone mit kleineren Insertionen erhalten wurden, muß angenommen werden, daß innerhalb der Soja- rDNS-Repeating-Unit Sequenzen enthalten sind, die beim Prozeß des Klonierens herausrekombiniert werden. Der Beweis für diese Annahme ist nicht einfach zu führen, da für das Verschwinden eines Molekülanteils in einem komplexen biologischen Prozeß kaum ein positiver Nachweis geführt werden kann. Eine DNS-Fraktion, die eindeutig mit ribosomaler RNS hybridisiert hatte, wurde in ein Klonierungsexperiment eingesetzt und danach nur klonierte DNS Fragmente erhalten, die nicht mehr hybridisieren. Dies bedeutet, daß die Coding-Sequenzen herausrekombiniert wurden. Wie dies geschieht und welche strukturellen Voraussetzungen von Seiten der Soja- rDNS-Repeating-Unit strukturell erfüllt werden müssen, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. In der Literatur sind solche oder ähnliche Probleme beim Klonieren bisher nicht beschrieben worden.

Eine erfolgreiche Soja- rDNS-Fragmentklonierung über

das λ-Phagen-System wurde kürzlich in der Literatur beschrieben (Varsanyi-Breiner et al., 1979). Die ergebnisse von verschiedenen Klonierungsexperimenten, bei denen unterschiedliche Klonierungstechniken angewandt wurden, lassen sich nur schwer vergleichen. Von keinem der heute benutzten Klonierungstechniken ist jeder Arbeitsschritt molekularbiologisch und biochemisch analysiert worden. Diese Techniken werden als Mehrschrittreaktionen angewandt, ohne daß jeder einzelne Teilschritt genau verstanden wird. Zudem ist wenig bekannt über die ersten Initiationsschritte der Replikationsmaschinerie in der Rezipientenzelle nach In-vitro-Transformation mit dem ligierten Plasmid. Die Klonierung mit Hilfe von Resistenzplasmiden wie pBR 322 unterscheidet sich von der mit dem Phagen vor allem durch unterschiedliche Replikationsschritte und deren zeitlicher Abfolge während der Vermehrung des Plasmids innerhalb der Wirtszelle. Bei der Verwendung des λ-Systems ist nach Verpackung rekombinanter λ-DNS jede weitere Replikation, Rekombination oder Reperatur ausgeschlossen. Dies kann dazu führen, daß die Klonierung einer bestimmten DNS-Sequenz bei Benutzung der einen Klonierungstechnik zum Erfolg führt, während bei einer anderen Technik auf Grund von strukturellen Eigenschaften der zu klonierenden DNS-Sequenz Probleme bei der Replikation auftreten.

Um die Frage zu überprüfen, ob angereicherte rDNS sich für die Klonierung eignet oder nicht, wurde CsCl-Actinomycin D-angereicherte rDNS mit der Tailing Methode (Rougeon et al., 1975) dem Klonieren unterzogen. Hierbei findet keine definierte Fragmentierung aller eingesetzten rDNS-Repeating-Units statt; die Struktur und Länge der eingesetzten

rDNS hängt von statistischen Doppelstrangbrüchen der DNS bei der Aufarbeitung ab. Diese statistisch fragmentierte rDNS ergab nach Tailing und nachfolgender Klonierung auch keine rDNS spezifischen Klone. Dies bedeutet, daß die Art und Weise der Fragmentierung der rDNS keinen Einfluß auf das Klonieren hat.

Die Tailing-Methode ergab, daß die höchste Rekombinanteneffizienz bei einer mittleren oligo-dC-bzw. dG-Länge von ungefähr 20 Nukleotiden vorliegt. Eine Verlängerung dieser Oligopolynukleotidstränge über 20 Nukleotide hinaus hat eine drastische Erniedrigung der Rekombinantenfrequenz zur Folge. Wahrscheinlich verhindern zu lange Oligonukleotideinzelstränge eine effektive komplementäre Paarung.

Die Klonierung von nicht vorfraktionierter, aber Hind III gespaltener Soja Gesamt-DNS ergab 4 rDNS-Klone, von denen jeweils zwei identisch waren. Ein Vergleich der klonierten Hind III-Fragmente mit der aus dem Gesamtgenom vorgenommenen Fragmentkartierung (Friedrich et al., 1979) ergibt, daß die klonierten Fragmente nicht mit denen aus der Fragmentkartierung identisch sind. Die geklonten Hind III- rDNS Fragmente sind nicht im genomischen Southern-Hybridisierungsblot darstellbar. Deshalb muß wiederum angenommen werden, daß die Sequenz der rDNS auf Grund von strukturspezifischen Gegebenheiten beim molekularbiologischen Mechanismus des Klonierens eine strukturelle Verkürzung erfährt. Eine solche Verkürzung kann nur bei der Replikation des rekombinanten Plasmids in der Wirtszelle erfolgen. Beim Klonieren von tierischen Genen wurden solche Phänomene bisher nicht beob-

Allerdings muß beobachtet werden, daß bei eukaryontischen Organismen bisher keine Kontroll- oder Regulatorsequenzen beschrieben wurden, die analog den Promotorsequenzen der Prokaryonten sind (Hager et al., 1977; Boer et al., 1979; Gilbert et al., 1979; Young und Steitz, 1979; Mueller et al., 1977).
Die Bindungsversuche wurden anlehnend an die von Reznikoff (1975) beschriebenen Versuche der Bindung von E.coli RNS-Polymerase an E.coli-DNS durchgeführt. Die Enzymassay-Optimierungsversuche mit Sojabohnen-RNS-Polymerase machen deutlich, daß das auf Prokaryonten abgestimmte Medium verändert werden mußte. Die Ionen-Konzentration wurde gegenüber dem prokaryontischen Assay gesenkt. Unter den optimalen Assaybindungen konnten Wechselwirkungen zwischen der RNS-Polymerase I von Soja und dem klonierten rDNS-Fragment festgestellt werden. Die Bindung der RNS-Polymerase I erfolgt offenbar nicht statistisch über das Gesamtfragment verteilt; Teile innerhalb dieser DNS-Sequenz werden bevorzugt. Diese Vorzugsregion konnte mit Hilfe zweier 4-Basen-Restriktionsenzyme eingegrenzt werden. Die Länge dieser DNS-Region mit etwa $0{,}3 \times 10^6$ Dalton ist zu groß, als daß man von einer Promotorregion sprechen kann. Die Dauer und Intensität der Bindung spricht eher dafür, daß es sich bei dieser Region um eine spezifische Erkennungssequenz handelt, an die die RNS Polymerase I zuerst bindet. Von hier aus könnte dann die Polymerase zum Promotor auf der DSN-Sequenz entlanggleiten.

Kürzlich erschienene elektronenmikroskopische Arbeiten über RNS-Polymerase-Bindungsstellen bzw. Promotoren im prokaryontischen Bereich (Calame et al., 1979;

achtet; bei pflanzlichen Systemen wurden von Meagher et al.(1979) solche Phänomene beschrieben. Eine genaue Analyse des Mechanismus der Längenreduzierung ist nicht möglich, da bis heute die Methode des Klonierens nicht bis in alle Einzelheiten des Ablaufs biochemisch aufgeklärt ist.

Die beiden erhaltenen rDNS-Klone pFKM 97/206 und pFKM 493/714 stellen etwa 25% bzw 14% der Gesamtlänge der Repeating-Unit dar. Die Hybridisierungsergebnisse identifizieren sie eindeutig als ribosomale Klone.

Der 1,3 x 10^6 Dalton- rDNS enthaltende Klon weist ein Restriktionsmuster auf, das schlecht in Einklang mit den Daten aus dem genomischen Southern Hybridisierungsblot der Sojabohne (Friedrich et al., 1979) zu bringen ist. Das Hind III-Abbaumuster mit seiner zweiten Schnittstelle legt den Schluß nahe, daß ein Umbau innerhalb der rDNS-Repeating-Unit vom Moment der Ligation an pBR 322-DNS bis zur Replikation im bakteriellen Wirt stattfand. Die Zuordnung der klonierten Sequenz in das genomische Fragmentierungsmuster geschieht mit Hilfe des 1,1 x 10^6 Dalton-Eco RI-Fragmentes. Dieses Fragment ist sowohl im klonierten rDNS-Abschnitt als auch im genomischen Blot nachweisbar. Unter der Voraussetzung, daß beide Banden identisch sind, stellt die klonierte rDNS-Sequenz den Anteil der 25 S rRNS-Coding-Region einer Repeating-Unit und dem Beginn der 18 S rRNS-Coding-Region der nächstfolgenden Repeating-Unit liegt (vgl. Abb. 28)

Diese klonierte DNS-Sequenz, die sehr wahrscheinlich zwischen jeweils zwei Coding-Regionen liegt, wurde verwendet, um die Lokalisation von RNS-Polymerase-Bindungsregionen bzw. Promotoren zu identifizieren.

Sogo et al., 1979), zeigen, daß pro kleinem Phagengenom (ϕ 29) sieben spezifische Bindungsstellen, und pro kleinem Resistenzplasmid (NTP 1) von $3,2 \times 10^6$ Dalton Größe etwa vier Promotoren vorhanden sind. Diese Daten liegen in der Größenordnung der lokalisierten Bindungsstellen innerhalb des pFKM 206 Plasmids.

Der Klon pFKM 659 zeigt ein Fragmentierungsmuster, das dem von rRNS-Coding-Sequenzen aus dem Soja-Gesamtgenom gleicht. Kein Fragment von pFKM 659 hybridisiert mit rRNS. Die Funktion Soja-Sequenzen von pFKM 659 bleibt unklar. Die Gesamtlänge der klonierten Sequenz reicht für den Codierungsbereich von etwa 5-10 Strukturgenen aus.

Die beiden identischen rDNS-Klone pFKM 493 und 714 besitzen jeweils ein kleines rDNS-Fragment. Dieses von zwei Hind III-Schnittstellen begrenzte Fragment ist in keinem genomischen rRNS-Hybridisierungsblot zu identifizieren. Auch bei diesen Klonen handelt es sich um einen rDNS-Sequenzanteil, der auf eine bisher ungeklärte Weise den größten Teil der Repeating-Unit, die von den beiden Hind III-Schnittstellen begrenzt wird, verlor. Die beiden Klone zeigen im DNS-RNS-Polymerase I-Bindungstest keine solchen Sequenzpräferenzen wie dies bei der Interaktion von Soja RNS-Polymerase I mit dem klonierten Fragment von pFKM 97 und 206 der Fall ist. (Daten nicht in 3. dargestellt)

Die Intensität der Bindung wurde durch Affinitätschromatographie getestet. Die Polymerase bindet so fest an die Sepharose-gebundene rDNS-Sequenz, daß

nach Elution durch hohes Salz die großen Enzymuntereinheiten mit einem Molekulargewicht von 1,33 und $1{,}36 \times 10^5$ Dalton noch immer an der DNS gebunden bleiben, während der Rest des komplexen Enzyms eluiert wird.

4.3. Komplexität der Soja m RNS

Die Experimente der Hybridisierung von vorfraktionierter poly A^+-und poly A^--RNS mit Gesamt-Soja DNS sollten die Frage klären, inwieweit durch diese Vorfraktionierung die Identifizierung von spezifischen Messengern- und somit Genen - möglich ist.

Nach Kartierung der 18 S- und 25 S ribosomalen Gene aus verschiedenen Pflanzen und der teilweisen Klonierung einer dieser Sequenzen, war es von Interesse zu untersuchen, ob die Analyse eines speziellen Gens auf analoge Weise möglich ist. Zur Charakterisierung eines Gens durch Restriktionskartierung ist es erforderlich, den für dieses Gen komplementären Messenger absolut rein vorliegen zu haben.

Das Gleiche gilt für die Identifizierung eines spezifischen Klons nach Klonierung von Teilen des Gesamtgenoms. Einige Komponenten der vorfraktionierten poly A^+-RNS ergaben nach Southern-Hybridisierung mit abgebauter-DNS verschiedene Hybridisierungsbanden. Es fällt auf, daß nicht jede der poly A^+-RNS-Fraktion mit Gesamt-Soja-DNS hybridisierten. Die Southern-Hybridisierung über Millipore Filter hat den Nachteil, daß die Filter nur eine begrezte Zeit im Hybridisierungsmedium verbleiben können, da sie wegen des Mediums (25% Formamid) und der Temperatur (60-65^{o}C) Zerfallerscheinungen zeigen. Somit ist es bei der limitierten Zeit nur möglich, in den Renaturierungsbereich der mittelrepetitiven Sequenzen vorzustoßen

(s. Anhang). Messenger-RNS, die komplementär zu reinen Unique-Sequenzen ist und ihrerseits keinen Reiterationsgrad innerhalb der mRNS-Gesamtpopulation besitzt, kann in diesem Zeitintervall nicht hybridisieren. Die erhaltenen Hybridisierungsbanden stammen somit entweder von mittelrepetitiven Genregionen, oder Unique-Sequenzen, die durch erhöhte Transkriptionsaktivität in einer großen RNS-Kopienzahl innerhalb der mRNS-Gesamtpopulation vorliegen.

Die poly A^+ Komponente 6 hybridisiert an ein Bam HI-DNS-Fragment von 1,7 x 10^6 Dalton. Dies entspricht einer Sequenz von 2575 Basenpaaren, groß genug um für etwa 1-3 Strukturproteine zu codieren. Die Komponente 12, die mit einem Bam HI-Fragment von 7,1 x 10^6 Dalton hybridisiert, identifiziert einen mittelrepetiven Genkomplex, der auf Grund seiner Länge Platz für 8-10 Strukturgene besitzt. Bei diesen Überlegungen wird jeweils eine mittlere Länge für ein Strukturgen von 1 000 - 1 500 Basenpaaren zu Grunde gelegt. Interessant bei dem 7,1 x 10^6 Dalton Bam HI-Fragment ist, daß die gleiche RNS-Spezies mit Eco RI abgebauter Soja-Gesamt-DNS Hybridisierungsbanden von 2,7 und 0,6 x 10^6 Dalton ergibt. Diese Aufspaltung legt die Vermutung nahe, daß das 7,1 Bam HI-Fragment sich aus zwei 2,7 x 10^6 Dalton und drei 0,6 x 10^6 Dalton Eco RI-Fragmenten zusammensetzt. Zugleich impliziert diese Annahme, daß es sich dann nur noch um 5-6 verschiedene Strukturgene handeln kann. Ein weiteres großes Bam HI-DNS-Fragment wird durch die RNS-Komponente 13 identifiziert (8,9 x 10^6 Dalton). Diese DNS-Sequenz ist groß genug, um für etwa 10-13 Strukturgene zu codieren. Die beiden letzten Peaks der fraktionierten poly

A^+-RNS, die Komponenten 16 und 17 hybridisieren mit identischen DNS-Fragmenten, die einen Codierungsbereich für etwa 4 potentielle Gene bereitstellen.

Unter Hybridisierungsbedingungen für redundante Sequenzen sind damit DNS-Sequenzen identifiziert worden, die in ihrer Gesamtheit für etwa 30 verschiedene Gene codieren. Diese Ergebnisse lassen entweder den Schluß zu, daß diese 30 Sequenzen mittelredundant im Gesamt Soja-Genom vorliegen oder daß sie Unique-Sequenzen darstellen, die eine sehr erhöhte Transkriptionsaktivität gegenüber dem Durchschnitt aller transkriptionsaktiven Gene aufweisen.

Renaturierungskinetische Untersuchungen an Soja über cDNS-poly A^+ RNS Hybridisierungen (Silflow, 1979) haben gezeigt, daß 0,001% der Unique-DNS-Sequenzen komplementär zu 18% der gesamten poly A^+ RNS ist, das sind 38 Gensequenzen. Diese 38 Gensequenzen stellen eine Gesamtkomplexität von $5{,}3 \times 10^4$ Basenpaaren dar. Untersuchungen an anderen höheren Pflanzen (Walbot 1976, Kiper et al.,1979, Goldberg et al., 1978, Wenzel (im Druck), 1980) haben zu vergleichbaren Ergebnissen geführt. Die oben beschriebenen durch Hybridisierung nachgewiesenen Sequenzen ergeben eine Gesamtkomplexität von $3{,}0 \times 10^4$ Basenpaaren.

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, die Funktion und Natur dieser Gene aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Von vier höheren Pflanzen wurde die Restriktionsfragmentkarte der ribosomalen DNS-Repeating-Unit erstellt und mit der Fragmentkarte von Glycine max. (Sojabohne) verglichen. Die untersuchten Objekte besitzen alle nur jeweils eine Hind III-Schnittstelle pro Repeating-Unit. Die Anzahl der Schnittstellen für die anderen Restriktionsenzyme variiert zwischen den verschiedenen Pflanzenspezies.

Die Größe der Repeating-Unit liegt für den Chinakohl (Brassica pekinensis), die Levkoje (Matthiola incana), die Mungobohne (Phaseolus aureus), und die Sojabohne (Glycine max.) zwischen 5,9 und 6,2 x 10^6 Dalton. Ein weiterer Vertreter der höheren Pflanzen, die Melone (Cucumis melo), ergibt einen stark abweichenden Wert von 7,6 x 10^6 Dalton.

Der Vergleich der Restriktionsfragmentkarten führt nur zu qualitativen Übereinstimmungen. Gemeinsamkeiten quantitativer Art wie z.B. Beibehaltung bestimmter definierter Größenfragmente zwischen den einzelnen Pflanzen-Spezies sind nicht nachzuweisen. Die Anordnung der Restriktionsschnittstellen zueinander und die Lokalisierung der einzelnen Fragmente legt eine Sequenzhomologie im Bereich der für die 18 S rRNS codierenden Region nahe. Dies gilt nicht in diesem Ausmaß für den 25 S rRNS-Codierungsbereich und nicht für die Spacersequenzen, in deren Bereich keine Übereinstimmungen festzustellen sind.

Die Klonierung von Soja-rDNS erwies sich als äußerst schwierig. Aus den unterschiedlichen Klonierungsansätzen konnte kein Klon erhalten werden, der eine gesamte Repeating-Unit enthielt. Teilfragmente der Repeating-Unit wurden nur bei der Klonierung mit dem Resistenzplasmid pBR 322 erhalten.

Bindungsexperimente von Soja-RNS-Polymerase I an ein kloniertes Soja-rDNS-Fragment führte zur Identifizierung einer präferentiellen Bindungsregion.

Die mit der Charakterisierung der rDNS gewonnenen Erfahrungen wurden zur Untersuchung der Gesamtkomplexität von poly-$(A)^+$- und poly-$(A)^-$-RNS aus Sojabohnen-Suspensionskulturzellen benutzt. Die präparative Fraktionierung der einzelnen RNS-Komponenten und anschließende Southern-Hybridisierung an Restriktionsendonuklease - abgebaute Gesamt-Soja-DNS identifizierte spezifische Gensequenzen; unter diesen sind vor allem diejenigen interessant, welche mit definierten Fraktionen aus einer poly-$(A)^+$-RNS-Population hybridisierten. Es wird diskutiert, ob es sich bei diesen DNS-Fragmenten um mittelrepetitiv vorkommende Strukturgene oder aber um Unique-Sequenzen handelt, die für mRNS mit großer Häufigkeit (abundante mRNS-Klassen) codieren. Die Untersuchung der biologischen Funktion dieser Gene bleibt einer weiteren Bearbeitung überlassen.

6. Literatur

Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M., Bähr, W., Frischauf, A.M., and Marquardt,M. (1975)

Covalent attachment of DNA to agarose. Improved synthesis and use in affinity chromotography

Eur. J. Biochem. 54, 411-418

Barnett, T., and Rae, M.M.P. (1979)

A 9.6. Kb intervening sequence in D. virilis r DNA, and sequence homology in r DNA interruptions of diverse species of Drosophila and other diptera

Cell 16, 763-775

Bell, G.H., De Gennary, L.J., Gelfand, D,H., Bishop, R.J., Valenzuela, P., and Rutter W.J. (1977)

Ribosomal RNA genes of Saccharomyces cereviseae. I. Physical map of the repeating unit and location of the regions coding for 5 S, 5,8 S, 18S and 25 S ribosomal RNAs.

J. Biol. Chem. 252, 8118-8125

Birnstiel, M.L., Wallace, H., Sirlin, J., and Fischberg, M. (1966)

Localization of the ribosomal DNA complements in the nucleolar organizer region of Xenopus laevis.

Nat. Cancer Inst. Monograph 23, 431-444

Birnstiel, M.L., (1978) s. Schaffner et al. (1978)

Blin, N., Sperazza, J.M., Wilson, F.E., Bieber, D.G., Mickel, S.F., and Stafford, D.W. (1979)

Organisation of the ribosomal RNA gene cluster in Lytechinus variegatus

J. Biol. Chem. 254, 2716-2721

de Boer, H.A., Gilbert, S.F., and Nomura, M. (1979)

DNA sequences of promotor regions for rRNA operons rrn E and rrn A in E.coli

Cell 17, 201-209

Botchan, P., Reeder, R.H., and Dawid, I.B. (1977)

Restriction analysis of the nontranscribed spacers of Xenopus laevis ribosomal DNA

Cell 11, 599-607

Brimacombe, R., Stöffler, G., Wittman, H.G. (1978)

Ribosome structure

Ann. Rev. Biochem. 47, 217

Calame, K.L., Yamada, Y., Shamblatt, S.H., and Nakada, D.

Location of promotor sites on plasmid NTP, which contains the ampicillin resistance transposon Tn 1701

J. Mol. Biol. 127, 397-409

Campell, G.R., Littau, V.C., Melera, P.W., Allfrey, V.G., and Johnson, E.M. (1979)

Unique sequence arrangement of ribosomal genes in the palindromic rDNA molecule of Physarum polycephalum

Nucleic Acids Res. 6, 1433-1446

Cory, S. and Adams, J.M. (1977)

A very large repeating unit of mouse DNA containing the 18 S, 28 S and 5,8 S rRNA genes

Cell 11, 795-805

Cox, B.J. and Turnock, G. (1973)

Synthesis and processing of ribosomal RNA in cultured plant cells

Eur. J. Biochem. 37, 367-376

Delseny, M., Aspart, L., Looke, R., Grellet, F., and Penon, P. (1979)

Restriction analysis of radish nuclear genes coding for rRNA: evidence for heterogeneity

Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 540-547

Engberg, J., Andersson, P., Leick, V., and Collins, J. (1976)

Free ribosomal DNA molecules from Tetrahymena pyriformis GL are giant palindromes

J. Mol. Biol. 104, 455-470

Free, S.J., Rice, P.W., and Metzenberg, R.L. (1979)

Arrangement of the genes coding for ribosomal ribonucleic acids in Neurospora crassa

J. Bact. 137, 1219-1226

Friedrich, H. (1978)

In-Vitro-Transkription und Restriktionsendonuklease-kartierung der Repeating-Unit und der Coding-Sequenzen der ribosomalen Gene von Glycine max.

Diplomarbeit, Tübingen

Friedrich, H., Hemleben, V., Meagher, R.B., and Key, J.L. (1979)

Purification and restriction endonuclease mapping of soybean 18 S and 25 S ribosomal RNA genes.

Planta 146, 467-473

Gamborg, O.L. Miller, R.A., Ojima, K, (1968)

Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells

Exp. Cell Res. 50, 151-158

Getz, M.J., Altenburg, L.C., Saunders, G.F. (1972)

The use of RNA labelled in vitro with iodine - 125 in molecular hybridization experiments

Biochim. Biophys Acta 287, 485-494

Gilbert, S.F., de Boer, H.A., and Nomura, M. (1979)

Identification of initiation sites for the in vitro transcription of rRNA operons rrn E and rrn A in E. coli

Cell 17, 211-224

Glisin, V., Crkvenjakov, R., and Byus, C. (1974)

Cloned segment of Drosophila melanogaster rDNA containing new types of sequence insertion

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4932-4936

Glover, D.M. and Hogness, D.S. (1977)

A novel arrangement of the 18 S and 28 S sequences in a repeating unit of Drosophila melanogaster rDNA

Cell 10. 167-176

Goldberg, R.B., Hoschek, G., Kamalay, J.C. (1978)

Sequence complexitiy of nuclear and polysomal RNA in leaves of the tobacce plant

Cell, 14, 123-131

Graziani, F. Caizzi, R., and Gargano, S. (1977)

Circular ribosomal DNA during ribosomal magnification in Drosophila melanogaster

J. Mol. Biol. 112, 49-63

Grierson, D. and Hemleben, V. (1977)

Evidence that in higher plants the 25 S and 18 S rRNA genes are not interspersed with genes for 5 S rRNA

Chromosoma 65, 353-358

Grummt, J., Soeilner, C., and Scholz, J. (1979)

Characterisation of a cloned ribosomal fragment from mouse which contains the 18 S coding region and adjacent spacer sequences

Nucleic Acids Res. 6, 1351-1369

Guilfoyle, T.J., Lin, C.Y., Chen, Y.M., and Key, J.L. (1976)

Purification and characterisation of RNA polymerase I from a higher plant

Biochim. Biophys. Acta 418, 344-357

Jenni, B. and Stutz, E. (1978)

Physical mapping of the ribosomal DNA region of Euglena gracilis chloroplast DNA

Eur. J. Biochem. 88, 127-134

Karrer, K.M. and Gall, J.G. (1976)

The macronuclear ribosomal DNA of Tetrahymena pyriformis is a palindrome

J. Mol, Biol. 104, 421-453

Kiper, M., Bartels, D., and Köchel, H. (1979)

Gene number estimates in plant tissues and cells

Pl. Syst. Evol., Suppl. 2, 129-140

Knopf, U.C. and Stutz, E. (1978)

Molekular cloning of the gene region coding for the chloroplast rRNA of Euglena gracilis

Molex. gen. Genet. 163, 1-6

Kushner, S.R. (1978)

An improved method for transformation of Escherichia coli with Col EI derived plasmids

in: Genetic Engineering, p. 17-23, Boyer, H.W., and Nicosia, S. (eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press

Lewin, B. (1974)

Gene expression-2, Eucaryotic Chromosomes

Wiley, New York

Lin, C.Y. and Key, J.L. (1971)

Dissociation of N_2 gas-induced monomeric ribosomes and functioning of the derived subunits in protein synthesis in pea

Plant Physiol. 48, 547-552

Maizels, N. (1976)

Dictyostelium 17 S, 25 S and 5 S r DNAs lie within a 38 000 base pair repeated unit

Cell 9, 431-438

Meagher, R.B., Eckenrode, V.K., Friedrich, H., Nagao, R.T., Kushner, S.R. (1979)

Instability of higher plant chromosomal DNA molecularly cloned in E. coli via rekombinant plasmids.

11. Miami Winter Symposia, Academic Press

Meyerink, J.H., Retel, J., Planta, R.H., and Heidekamp, F. (1976)

Topographical analysis of yeast ribosomal DNA by cleavage with restriction endonucleases

Mol. Biol. Rep. 2, 393-400

Molgaard, H.V., Matthews, H.R., and Bradbury, E.M. (1976)

Organisation of genes for ribosomal RNA in Physarum polycephalum

Eur. J. Biochem. 68, 541-549

Mueller, K., Oebbecke, C., Förster, G. (1977)

Capacity of ribosomal RNA promotors of E. coli to bind RNA polymerase

Cell 10, 121-130

Oono, K. and Suguira, M. (1980)

Heterogeneity of the ribosomal RNA gene clusters in Rice

Chromosoma 76, 85-89

Reznikoff, W.S. (1976)

Formation of the RNA polymerase-lac promotor open complex
in: RNA-polymerase; Losick, R., Chamberlin, M. (eds) Cold Spring Harbor Laboratory, p. 441-454

Richter, G. (1973)

Vorstufen der ribosomalen RNA in frei suspendierten Calluszellen der Petersilie (Petroselinum sativum)

Planta (Berl.) 113, 79-96

Rigby, P.W.J., Dieckman, M, Rhodes, C., and Bery, P. (1977)

Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nicktranslation with DNA polymerase I.

J. Mol. Biol..49, 681-692

Rogers, M.E., Loenung, U.E., Fraser, R.S.S. (1970)

Ribosomal RNA precursors in plants

J.Mol. Biol. 49, 681-692

Rougeon, F., Kourilsky, P., and Mach, B. (1975)

Insertion of a rabbit beta globin gene sequence into an E. coli plasmid

Nucleic Acids Res. 2, 2365

Schaffner, W., Kunz, G., Daetwyler, H., Telford, J., Smith, H.B., and Birnstiel, M.L. (1978)

Genes and spacers of cloned sea urchin histone DNA analysed by sequencing

Cell 14, 655-672

Seeburg, P.H., Shine, H., Martial, H.A., Baxter, H.D., and Goodman, H.M., (1977)

Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone

Nature 270, 486-494

Silflow, C.D. and Key, J.L. (1979)

Stability of polysome-associated polyadenylated RNA from Soybean suspension culture cells

Biochemistry 18, 1013-1018

Silflow, C.D., Hammett, J.R., and Key, J.L. (1979)

Sequence complexity of polyadenylated ribonucleic acid from soybean suspension culture cells

Biochemistry 18, 2725-2731

Sogo, H.M., Inciarte, M.R., Corral, J., Cinuela, E., and Salas, M. (1979)

RNA polymerase binding sites and transcription map of the DNS of Bacillus subtilis phage ϕ 29

J. Mol. Biol. 127, 411-436

Southern, E.M. (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoreses

J. Mol. Biol. 98, 503-517

Tartof, K.D. (1975)

Redundant genes

Ann. Rev. Genet. 9, 355-385

Taylor, W.C., Cockburn, A.F., Frankel, G.A., Newkirk, M.J., and Firtel, R.A. (1977)

Organisation of ribosomal and 5 S coding regions in Dictyostelium discoideum, p. 309-313 in:Molekular approaches to eucaryotic systems, vol.6. ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Wilcox, G., Abelson, J., and Fox, C.F. (eds.) Academic Press Inc., New York

Varsanyi-Breiner, V., Gusella, J.F., Keys, C., Housman, D.E., Sullivan, D., Brisson, N., and Verma, D.P.S. (1974)

The organisation of a nuclear DNS Sequence from a higher plant: molecular cloning and characterisation of soybean ribosomal DNA

Gene 7, 317-334

Vogt, V.M. and Braun, R. (1976)

Structur of ribosomal DNA in Physarum polycephalum

J. Mol. Biol. 106, 567-587

Walbot, V. and Dure, L. (1976)

Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. VII. Characterisation of the cotton genome

J. Mol. Biol. 31, 349-370

Wellauer, P.K., Dawid, J.B., Brown, D.D., and Reeder, R.H. (1976a)

The molecular basis for length hetrogeneity in ribosomal DNA fram Xenopus laevis

J. Mol. Biol. 105, 461-486

Wellauer, P.K., Reeder, R.H., Dawid, J.B., and Brown, D.D. (1976b)

The arrangement of length heterogeneity in repeatig units of ribosomal DNA from Xenopus laevis

J.Mol. Biol. 105, 487-505

Wellauer, P.K. and Dawid, J.B. (1977)

The structural organisation of ribosomal DNA in Drosophila melanogaster

Cell 10, 193-212

Wenzel, W. (1980) Promotion, Tübingen (im Druck)

White, R.L. and Hogness, D.S. (1977)

R loop mapping of the 18 S and 28 S sequences in the long and short repeating units of Drosophila melanogaster r DNS

Cell 10, 177-192

Wittmann, H.B. (1976)

Structure, function and evolution of ribosomes

Eur. J. Biochem. 61,1

Young, R.A. and Steitz, J.A. (1979)

Tandem promotors direct E. coli ribosomal RNA synthesis

Cell 17, 225-234

7. Anhang

7.1. Kinetik der DNS-RNS-Polymerase I-Bindung

Die in 2.5.5. durchgeführten Experimente zur Maskierung von Restriktionsendonukleasenschnittstellen durch RNS-Polymerase I setzen voraus, daß die Kinetik des DNS-Proteinkomplexes vorher untersucht wird. Mehrere Experimente wurden durchgeführt, bei denen die Inkubationszeit der DNS mit RNS-Polymerase verändert wurden (Abb. 29 a und b).

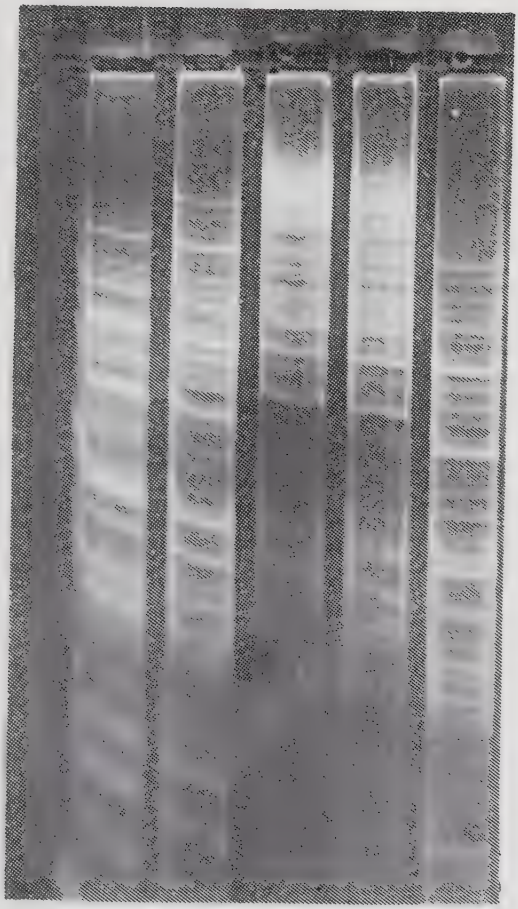
Deutlich ist zu erkennen, daß der Komplex nach 10 Minuten Inkubation wieder zerfällt, nach 20 Minuten Inkubation nahezu keine Maskierung mehr festzustellen ist und eine optimale Maskierung nach 5 Minuten Inkubation erreicht wird.

Dies gilt sowohl für ein Gesamt-Plasmid (pFKM 206) als auch für die aus diesem Plasmid isolierte rDNS-Insertion (pFKM 206-rDNS-Insertion).

a

A B C D

b



E D C B A

Abbildung 29: Kinetik der DNS-RNS-Polymerase I-Bindung

Jeweils 1 µg pFKM 206-DNS (Abb. 21b) bzw. pFKM-Insertions-rDNS (Abb. 29a) wurden wie unter 2.5.5. beschrieben zu verschieden langer Zeit mit RNS-Polymerase I inkubiert.

Abb. 29a: pFKM 206-Insertion-rDNS wurde

A 0 min
B 2 min
C 5 min
D 10 min

mit RNS-Polymerase I inkubiert.

Abb. 29b: pFKM 206-DNS wurde

A 0 min
B 2 min
C 5 min
D 10 min
E 20 min

mit RNS-Polymerase I inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation wurde jeweils mit Alu I-Restriktionsendonuklease abgebaut und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt.

7.2. Berechnung des erreichbaren $r_o t$-Wertes bei Hybridisierung der vorfraktionierten RNS mit Gesamt-Soja-DNS

Ein nach Southern eluierter Filterstreifen enthält 2 µg restriktionsfragmentierte DNS; dies entspricht $1{,}8 \times 10^{15}$ Basenpaaren. Das Soja-Gesamtgenom besteht aus $1{,}4 \times 10^{9}$ Basenpaaren. Dies bedeutet, das Soja-Genom ist $1{,}3 \times 10^{6}$fach auf einem Filterstreifen vorhanden. Der DNS-Anteil bei der Hybridisierungsreaktion ist fest fixiert. Die mobile Komponente, die die Geschwindigkeit der Reaktion beeinflußt, ist die markierte RNS.

Sie ist in einer Konzentration von 0,2 µg/ml in der Hybridisierungslösung vorhanden. Dies ergibt folgenden $r_o t$-Wert nach 72 Std Inkubation:

$$0{,}2 \text{ mg RNS/l} = 3{,}0 \times 10^{-7} \text{M}$$

$$r_o t = \frac{\text{Mol}}{\text{l}} \cdot \text{Zeit (sec)}$$

$$3{,}0 \times 10^{-7} \text{M} \times 72 \times 60 \times 60 = 7{,}9 \times 10^{-2}$$

Dieser $r_o t$-Wert liegt im Renaturierungsbereich der hoch- und mittelrepetitiven Sequenzen.

Lebenslauf

3.10.1952	geboren in Treysa (Hessen) als Sohn des Karl Friedrich, Bankkaufmann und seiner Ehefrau Elli Friedrich, geb. Hebeler
1959	Grundschule Borken
1962	Gesamtschule Kirchhain
1965	Theodor Heuss Schule (Gymnasium) Homberg
1971	Abitur
1971-1978	Biochemie/Biologie-Studium, Universität Tübingen
1977	8 Monate Forschungsaufenthalt am Botany Department der University of Georgia, Athens, U.S.A.
1978	Diplom in Biologie an der Universität Tübingen Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. V. Hemleben Thema: In-vitro-Transkription und Restriktionsendonuklease-Kartierung der Repeating-Unit und der Coding-Sequenzen der ribosomalen Gene von Glycine max
1978-1980	Dissertation am Lehrstuhl für Genetik der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. V. Hemleben Thema: Genkartierung und Klonierung von ribosomaler DNS höherer Pflanzen, Bindungsstudien mit RNS-Polymerase I und Ansätze zur Strukturgenisolierung aus Sojabohnenzellen
1979	6 Monate Forschungsaufenthalt am Botany Department der University of Georgia, Athens, U.S.A.

Meine akademischen Lehrer waren:
Braun, Feine, Flohe, Fischer, Gönnenwein, Guglielmi, Hagenmaier, Hausen, Hennig, Hillmann, Krüger, Machlaidt, Mauser, Metzner Mörike, Müller, Ninnemann, Probst, Sander, Seyffert, Wöhrmann, Zähner

Herstellung und Druck: B. Kleine Blitzdruck GmbH, Friedrich-Verleger-Str. 10-12
4800 Bielefeld 1, Telefon 05 21 / 17 31 97